

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA GRACIA POITEVIN

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE
SUPERFÍCIES METÁLICAS NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ, PARÁ,
BRASIL

CURITIBA

2014

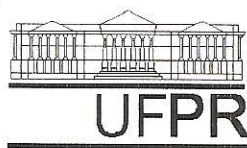
CAROLINA GRACIA POITEVIN

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE
SUPERFÍCIES METÁLICAS NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ, PARÁ,
BRASIL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia do Rocio Dalzoto

CURITIBA
2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Caracterização polifásica de micro-organismos isolados de superfícies metálicas na Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Pará, Brasil”

Por

CAROLINA GRACIA POITEVIN

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Patrícia do Rocio Dalzoto (presidente)

Prof^a. Dr^a. Lillian Cristina Côcco

Prof^a. Dr^a. Lucy Ono

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dra. Patricia Dalzoto e Dra. Ida Pimentel, pela ajuda e pelo incentivo desde o início.

Ao Dr. Marcos Antonio Coelho Berton, por intermediar o contato com a Eletronorte, o que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Lactec e à Eletronorte, pelo financiamento deste trabalho, e à Capes, pela bolsa.

Ao Senai, por permitir os testes de infravermelho com as bactérias.

Ao Lacaut, especialmente à Dra. Lilian Côcco, pela ajuda inestimável nas análises de infravermelho, e pelo incentivo nas vezes em que não aguentava mais ver a sigla PLS.

Ao Departamento de Patologia Básica e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela ajuda sempre que necessário, sejam durante as aulas, ou no decorrer do trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial ao Laboratório de Oxidações Biológicas, por permitir as leituras de microdiluição, e ao Valter Baura, pela socorro na realização dos sequenciamentos.

Aos amigos do LabMicro, que me incentivaram nas horas em que o desânimo chegava, que festavam nas horas alegres, e, principalmente, fizeram parte deste trabalho, seja para preparar um meio de cultura ou todo um experimento.

À Angela Bozza, minha companheira na “História da Pastilha”, por tornar a experiência do infravermelho muito mais agradável.

Ao Paulo Marangoni, pois sem ele nada disso seria feito.

Ao meu irmão Cristiano, espero continuar sendo motivo de orgulho para você.

Aos meus pais, Rosangela e Raul, pelo amor, paciência, incentivo, e por sempre me fazerem acreditar que os sonhos podem se tornar realidade.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Deus.

RESUMO

A corrosão influenciada por micro-organismos (CIM) é a mudança do potencial eletroquímico na interface metal/solução, causado pela produção de metabólitos de bactérias e fungos que crescem aderidos a superfícies metálicas na forma de biofilmes. O conhecimento da microbiota dos biofilmes permite a escolha do melhor antimicrobiano a ser utilizado para reduzir os efeitos da CIM. A abordagem polifásica, que consiste na associação de técnicas morfológicas, químicas e genéticas, é interessante para uma correta caracterização de micro-organismos. A espectroscopia no infravermelho aparece como uma opção para a identificação de fungos e bactérias devido à rapidez na execução e ao menor custo, quando comparado com as demais técnicas. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a identificação polifásica de micro-organismos presentes em corpos de prova metálicos instalados na Usina Hidrelétrica de Tucuruí (PA), e a avaliação do melhor biocida a ser utilizado para o controle da formação de biofilmes. As coletas foram feitas a cada dois meses entre 2011 e 2012, e os micro-organismos identificados por macro e micromorfologia, bioquímica e biologia molecular. Os antimicrobianos Orobor, MXD-100 (MaxClean®), hidróxido de sódio, extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foram testados quanto a sua eficiência. Os dados foram analisados por ANOVA ($p < 0,01$) seguido por teste de Scott-Knott para comparação das médias ($p < 0,05$). Foram isoladas 358 bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, pertencentes em sua maioria aos gêneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*. Foi verificada a presença de bactérias redutoras de sulfato e bactérias oxidantes de ferro, além do isolamento de 94 fungos, com predomínio dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Os antimicrobianos MXD-100 1 ppm e 3 ppm, Orobor 10 mL/L e NaOH pH 14 foram os mais eficientes no controle, reduzindo em aproximadamente 35% o crescimento bacteriano e fúngico. A espectroscopia no infravermelho foi testada para classificação microbiana, e se mostrou eficiente na identificação de fungos filamentosos, mas novas metodologias devem ser testadas para a identificação bacteriana. A caracterização de micro-organismos encontrados nos corpos de prova metálicos mostra a biodiversidade da região e está relacionada ao processo de biocorrosão, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

Palavras chave: Biofilme, biocorrosão, biocida e NIRS.

ABSTRACT

Microbially Influenced Corrosion (MIC) is the change of electrochemical potential at the interface metal/solution, caused by metabolites produced by bacteria and fungi growing in metallic surfaces as biofilms. The knowledge of biofilms' microbiota allow us to choose the best biocide to reduce the effects of MIC. Polyphasic approach, consisting in associate morphological, chemical and genetical techniques, is interesting for the correct characterization of micro-organisms. Infrared spectroscopy shows up as an option to identify fungi and bacteria because of faster response and lower costs, when compared with other techniques. The aim of this work were the isolation and the polyphasic identification of micro-organisms present in metallic coupons installed in Tucuruí's Power Plant (PA), and the evaluation of the best biocide to be used for the control of biofilm formation. Samples were collected every two months during 2011 and 2012, and micro-organisms were identified by macro and micromorphology, biochemical assays and molecular tools. The efficiency of biocides Orobor, MXD-100 (MaxClean[®]), sodium hydroxide, *Schinus terebinthifolius* extract and *Ilex paraguariensis* extract were tested. Data were analyzed by ANOVA ($p < 0.01$) followed by Scott-Knott test for comparison of means ($p < 0.05$). It was isolated 358 aerobic or facultative anaerobic bacteria, belonging mostly to the genera *Bacillus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Acinetobacter*. Sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria were also found, in addition of isolation of 94 fungi, with prevalence of the genera *Penicillium* and *Aspergillus*. MXD-100 1 ppm and 3 ppm, Orobor 10 mL/L and NaOH pH 14 were the most efficient biocides, reducing approximately 35% of bacteria and fungi. Infrared spectroscopy was tested for micro-organisms classification, and it was efficient to identify filamentous fungi, but new methodologies need to be tested to bacterial identification. The characterization of micro-organisms found on metal surfaces highlights the biodiversity of the region and can be related to the process of biocorrosion, enabling the development of new strategies for its control.

Key words: Biofilm, biocorrosion, biocide and NIRS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CAPACIDADE ENERGÉTICA BRASILEIRA INSTALADA ATÉ 31 DE DEZEMBRO DE 2012	21
FIGURA 2 – USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ.....	22
FIGURA 3 – ETAPAS PARA A FORMAÇÃO DO BIOFILME EM SUPERFÍCIES METÁLICAS	24
FIGURA 4 – CUSTO DA CORROSÃO POR CATEGORIAS	25
FIGURA 5 – ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO	35
FIGURA 6 – CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA METÁLICOS.....	39
FIGURA 7 – ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DE BIOCORROSÃO INSTALADA NA MÁQUINA UGH9 DA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ.....	40
FIGURA 8 – CORPOS DE PROVA ANTES E DEPOIS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE UMA SEMANA ÀS ÁGUAS DA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ.....	53
FIGURA 9 – ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ COLORADOS COM GRAM	58
FIGURA 10 – BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA COM CARACTERÍSTICA FILAMENTOSA CORADA COM GRAM.....	62
FIGURA 11 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,4% APÓS PCR COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O GRUPO 6 DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	64
FIGURA 12 – MICROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ISOLADOS OBTIDOS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ	66
FIGURA 13 – ISOLADO AC15 4, IDENTIFICADO COMO <i>Westerdykella dispersa</i> ..	72
FIGURA 14 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Westerdykella</i> , <i>Pycnidiotheca</i> E <i>Phoma</i> BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.	72
FIGURA 15 – ISOLADO AC48 4, IDENTIFICADO COMO <i>Bionectria ochroleuca</i>	73
FIGURA 16 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Bionectria</i> E <i>Acremonium</i> BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.	74

FIGURA 17 – ISOLADO AC11 2, IDENTIFICADO COMO <i>Hypoxylon fragiforme</i>	75
FIGURA 18 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Hypoxylon</i> E <i>Nigrospora</i> BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.....	76
FIGURA 19 – ISOLADO AC21 4, IDENTIFICADO COMO <i>Sporothrix inflata</i>	77
FIGURA 20 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Sporothrix</i> E <i>Acremonium</i> BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DO GENE PARCIAL DA BETA-TUBULINA E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.....	78
FIGURA 21 – ISOLADO AC7 2, IDENTIFICADO COMO <i>Auxarthron chlamydosporum</i>	79
FIGURA 22 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Auxarthron</i> E <i>Chrysosporium</i> BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.....	79
FIGURA 23 – ISOLADO AC38 3, IDENTIFICADO COMO <i>Microsphaeropsis arundinis</i>	80
FIGURA 24 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Microsphaeropsis</i> E <i>Chrysosporium</i> BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.....	81
FIGURA 25 – ESPECTRO DO CLOROFÓRMIO REGISTRADO ATRAVÉS DE FT-IR. REGIÕES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	83
FIGURA 26 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BACTÉRIAS QUANTO À ESPÉCIE POR TRANSMITÂNCIA.....	84
FIGURA 27. ESPECTRO DE <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i> ANALISADO POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRIFT)	85
FIGURA 28 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS POR ATR.....	86
FIGURA 29 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS POR TRANSMITÂNCIA	86
FIGURA 30 – ESPECTRO DE 9 ESPÉCIES DE FUNGOS ANALISADOS POR TRANSMITÂNCIA. REGIÕES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	87

FIGURA 31 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS QUANTO AO GÊNERO POR TRANSMITÂNCIA.....	88
FIGURA 32 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS QUANTO AO GÊNERO POR TRANSMITÂNCIA.....	90

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CENTRAIS GERADORAS DE ENERGIA ELÉTRICA NO BRASIL POR REGIÃO	22
QUADRO 2 – COMPRIMENTOS DE ONDA UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO, COM SUAS RESPECTIVAS MOLÉCULAS DOMINANTES E GRUPOS FUNCIONAIS	36
QUADRO 3 – SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DO rDNA 16S RECOMENDADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS BRS.....	45
QUADRO 4 – SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	46
QUADRO 5 – CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RNA RIBOSSOMAL, PARTE DO GENE DA β -TUBULINA, FATOR DE ELONGAÇÃO DA TRADUÇÃO 1- α E SUBUNIDADE II DA RNA POLIMERASE	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RELAÇÃO DE CORPOS DE PROVA COLETADOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ, IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS, TEMPO DE EXPOSIÇÃO E DATA DE COLETA	52
TABELA 2 – CONTAGEM DE BACTÉRIAS TOTAIS E FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ	54
TABELA 3 – DETECÇÃO DE BACTÉRIAS OXIDANTES DE FERRO ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ, APÓS CULTIVO EM MEIO SELETIVO LEATHEN-MCINTYRE-BRALEY POR 20 DIAS A 30°C	61
TABELA 4 – DETECÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ, APÓS CULTIVO EM MEIO ESPECÍFICO POR 50 DIAS A 30°C EM ESTUFA DE ANAEROBIOSE, E APÓS PCR ESPECÍFICA	63
TABELA 5 – IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ISOLADAS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S DO RNA RIBOSSOMAL UTILIZANDO O PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O GRUPO 6	64
TABELA 6 – IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ POR SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS-1, 5.8S E ITS-2, E DOS GENES DA BETA-TUBULINA, FATOR DE ELONGAÇÃO E RNA POLIMERASE	68
TABELA 7 – LISTA, NÚMERO DE ISOLADOS FÚNGICOS E NÚMERO DE REPLICATAS UTILIZADOS NA CRIAÇÃO DO BANCO DE DADOS	89
TABELA 8 – PREDIÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS QUANTO AO GÊNERO POR TRANSMITÂNCIA	90

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONTAGEM BACTERIANA PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT (COM PROBABILIDADE AO NÍVEL DE 5%) E VAZÃO BRUTA DO RIO TOCANTINS NO PERÍODO DAS COLETAS	56
GRÁFICO 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONTAGEM FÚNGICA PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT (COM PROBABILIDADE AO NÍVEL DE 5%) E VAZÃO DO RIO TOCANTINS NO PERÍODO DAS COLETAS.....	57
GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ EM CADA COLETA E NO TOTAL.....	59
GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ EM CADA COLETA E NO TOTAL.....	60
GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ	65
GRÁFICO 6 – EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS CONTRA AS BACTÉRIAS <i>Bacillus</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp. ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ	93
GRÁFICO 7 – EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS CONTRA POOL DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ	94
GRÁFICO 8 – EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS CONTRA O FUNGO <i>Penicillium citrinum</i> , ISOLADO A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflectância total atenuada
BDA	Meio batata dextrose ágar
benA	Beta-tubulina
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
BRS	Bactéria redutora de sulfato
CaF ₂	Fluoreto de cálcio
CIM	Corrosão influenciada por micro-organismos
CP	Corpo de prova
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
DRIFT	Reflectância difusa
e ⁻	Elétron
ef-1 α	Fator de elongação α
EPS	Substância polimérica extracelular
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
H ⁺	Radical hidrogênio
H ₂	Gás hidrogênio
H ₂ O	Água
ITS	Região interespaçadora
ITS1	Região interespaçadora (18S-5.8S)
ITS2	Região interespaçadora (5.8S – 28S)
log	Logaritmo de base 10
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MW	Megawatts, equivale a 10 ⁶ W
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂	Gás oxigênio

OH ⁻	Radical hidroxila
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais
PVC	Policloreto de vinila
RNA	Ácido ribonucleico
rDNA	Ácido desoxiribonucleico ribossomal
rpb2	Subunidade II da RNA polimerase
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
TSA	Meio <i>tryptic soy agar</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UGH	Unidade geradora hidrelétrica
UHE	Usina hidrelétrica de energia
ZnSe	Seleneto de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Matriz energética brasileira	21
3.2 Biofilmes	23
3.3 Biocorrosão	25
3.4 Controle microbiano	26
3.5 Técnicas clássicas para identificação de micro-organismos	30
3.6 Técnicas moleculares	32
3.7 Espectroscopia no infravermelho	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Amostragem	39
4.2 Meios de cultivo	40
4.3 Preparo de inóculo	42
4.4 Isolamento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas totais	43
4.5 Identificação de bactérias	43
4.6 Presença de bactérias oxidantes de ferro	44
4.7 Presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS)	44
4.8 Identificação de bactérias redutoras de sulfato	44
4.9 Isolamento de fungos	45
4.10 Identificação fúngica	46
4.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
4.12 Padronização da técnica de espectroscopia no infravermelho	49

4.13 Avaliação da eficiência <i>in vitro</i> dos antimicrobianos MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e extratos de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) e aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i>) no controle de micro-organismos isolados dos corpos de prova ..	50
4.14 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Corpos de prova	52
5.2 Contagem de bactérias totais e fungos.....	54
5.3 Identificação de bactérias	58
5.4 Presença de bactérias oxidantes de ferro.....	60
5.5 Presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS)	62
5.6 Identificação dos fungos	65
5.7 Comparação de identificação morfológica e molecular	71
5.8 Padronização da técnica de espectroscopia no infravermelho	81
5.9 Construção de banco de dados de espectros de fungos por espectroscopia no infravermelho	87
5.10 Avaliação da eficiência <i>in vitro</i> dos antimicrobianos MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e extratos de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) e aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i>) no controle de micro-organismos isolados dos corpos de prova ..	92
6 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
Apêndice 1 – Análise estatística da contagem bacteriana pelo Teste de Scott-Knott	113
Apêndice 2 – Análise estatística da contagem fúngica pelo Teste de Scott-Knott ..	115
Apêndice 3 – Análise estatística da eficiência dos biocidas contra o pool bacteriano pelo Teste de Scott-Knott.....	117
Apêndice 4 – Análise estatística da eficiência dos biocidas contra <i>Penicillium citrinum</i> pelo Teste de Scott-Knott.....	119

1 INTRODUÇÃO

A geração de energia no Brasil é proveniente de hidrelétricas, termoeletricas (gás natural, petróleo, biomassa, nuclear e carvão mineral), centrais geradoras eólica e solar. Entretanto, a energia hidráulica é a mais utilizada. São 1064 centrais que totalizam aproximadamente 70% da produção nacional. A bacia do Tocantins/Araguaia possui potencial de 28000 MW, dos quais 8535 MW são aproveitados pela usina hidrelétrica Tucuruí I e II, no Pará. Tucuruí é a responsável pela maior parte da energia produzida no país (ANEEL, 2014).

Devido à oscilação da temperatura de suas águas, o Brasil apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento de biofilmes, que consiste na deposição de micro-organismos a superfícies sólidas (MACIEL FILHO, 1982). O biofilme é composto predominantemente de água, e os micro-organismos representam apenas 10% da massa seca. Os 90% restantes referem-se à matriz formada por biopolímeros extracelulares, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que geram uma estrutura tridimensional favorável à adesão e coesão do biofilme (FLEMMING; WINGERDER, 2010).

Entretanto, o acúmulo de biofilme ocasiona um problema chamado *biofouling*. Isso ocorre porque a excreção de metabólitos, como enzimas, ácidos orgânicos e amônia, altera o potencial eletroquímico da interface metal/solução colonizados, favorecendo a corrosão influenciada por micro-organismos (CIM) (VIDELA; HERRERA, 2004). A CIM afeta diversos setores da economia, podendo ser citadas a indústria naval, química e bioquímica, usinas de geração energética e sistemas de distribuição de água, e atua limitando a transferência de calor e massa em tubulações e tanques (BEECH, 2004). Entre os micro-organismos encontrados nos biofilmes causadores da corrosão microbiana, podem-se citar as enterobactérias, bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, bactérias redutoras de sulfato, bactérias oxidantes do ferro, bactérias oxidantes do enxofre e fungos filamentosos (MARANGONI *et al.*, 2013).

Embora a formação do biofilme envolva a cooperação entre diferentes espécies, o que altera as vias metabólicas, o isolamento e a identificação dos micro-organismos envolvidos podem aumentar o conhecimento sobre este processo

(WINTERMUTE; SILVER, 2010). Porém, alguns tipos bacterianos, como bactérias sulfato redutoras ou bactérias oxidantes do enxofre, são de difícil isolamento, o que torna o entendimento do processo ainda mais complicado. Além disso, outros micro-organismos, cujo crescimento não é tão fastidioso, exigem uma abordagem polifásica para sua correta identificação. Nesta, dados de caracteres morfológicos (macro e microscópicos), fisiológicos e bioquímicos necessitam ser aliados a dados de análise genética, seja por marcadores moleculares ou mesmo por sequenciamento de determinadas regiões do DNA (VANDAMME *et al.*, 1996).

A necessidade de novas técnicas mais rápidas e baratas para identificação destes micro-organismos levou à utilização da espectroscopia no infravermelho, técnica promissora devido à grande quantidade de informação gerada (BARTH; HARRIS, 2009). Como ferramenta taxonômica em biologia, a espectroscopia no infravermelho tem sido estudada em diversos *taxa*, como vírus, algas, plantas, fungos, bactérias e nematóides. Esta técnica pode ser uma alternativa complementar aos dados obtidos por morfologia e biologia molecular, levando ao aumento da acurácia na identificação, bem como à diminuição do tempo despendido para tal (ALVAREZ-ORDÓÑEZ; PRIETO, 2012). A espectroscopia no infravermelho é capaz, inclusive, de detectar diferentes padrões de metabolismo, como uma impressão digital característica de cada grupo celular (RUBIO *et al.*, 2006). Isso ocorre devido ao aumento da vibração de átomos quando estimulados pelo infravermelho. Assim, diferentes moléculas terão absorções específicas (SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

A melhor maneira de se evitar a formação do biofilme é prevenir a adesão microbiana, através de limpeza e desinfecção regular. Para tal, agentes antimicrobianos podem ser utilizados no intuito de impedir ou diminuir a adesão de micro-organismos às superfícies. Entretanto, devem ser levadas em conta as características dos micro-organismos envolvidos. O biocida mais adequado depende de suas características químicas e principalmente da morfologia das células a serem atacadas. Devido a isso, é importante o conhecimento dos tipos celulares presentes no biofilme (BRIDIER *et al.*, 2011).

O presente trabalho visou isolar, quantificar e identificar micro-organismos potencialmente produtores de biofilme, de corpos de prova metálicos (aço carbono e aço inox) instalados na Usina Hidrelétrica Tucuruí, Pará, Brasil. Estes corpos de prova encontram-se instalados em máquinas irmãs na referida usina. Os micro-

organismos isolados foram quantificados e identificados por meio de técnicas microbiológicas clássicas, moleculares e espectroscopia no infravermelho. Ainda, foram testados biocidas (NaOH, MXD-100, Orobor e extratos de erva-mate e aroeira) contra suspensões de micro-organismos isolados dos corpos de prova, visando estabelecer a melhor forma no controle da formação do biofilme.

Com o isolamento, quantificação e identificação dos micro-organismos envolvidos no processo de biocorrosão, bem como a determinação da sua suscetibilidade aos biocidas, será possível desenvolver novas estratégias para reduzir seu efeito e diminuir as perdas econômicas nesse importante setor da economia.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral isolar, quantificar e identificar micro-organismos potencialmente produtores de biofilme, de corpos de prova metálicos instalados na Usina Hidrelétrica Tucuruí, Pará, Brasil; e testar os biocidas NaOH, MXD-100, Orobor e extratos de erva-mate e aroeira contra suspensões destes micro-organismos.

Os objetivos específicos são:

- a) Isolar micro-organismos a partir de corpos de provas metálicos instalados na Usina Tucuruí, e quantificar por meio de contagem direta;
- b) Identificar bactérias aeróbias por meio de macro e micromorfologia e provas bioquímicas;
- c) Identificar Bactérias Oxidantes de Ferro por meios seletivos e microscopia óptica;
- d) Identificar Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) por meio de crescimento em sistema de anaerobiose e por PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos;
- e) Identificar fungos por macro e micromorfologia e por sequenciamento de nucleotídeos das regiões ITS do DNA ribossomal, porção do gene *benA* referente a β -tubulina, e genes *ef-1 α* e *rpb2*, respectivamente referentes a fator de elongação α e subunidade II da RNA polimerase;
- f) Padronizar a metodologia para identificação de micro-organismos por espectroscopia no infravermelho;
- g) Construção de banco de dados de espectros de fungos por espectroscopia no infravermelho para identificação ao nível de gêneros e espécies;
- h) Testar os biocidas MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e os extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*) contra os micro-organismos isolados dos corpos de prova, visando determinar sua eficiência e propor estratégias mais apropriadas para o controle da formação de biofilmes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Matriz energética brasileira

Embora pouco utilizada a nível mundial, a energia hidráulica representa a maior parte da energia elétrica produzida no Brasil (FIGURA 1). De acordo com o Plano 2015 da Eletrobrás, o Brasil é o país com maior potencial hidrelétrico. Isso se deve à presença de água doce em abundância, que flui por desníveis proporcionando a energia mecânica necessária para movimentar as turbinas das usinas. O uso da energia hidráulica é vantajoso por apresentar baixo custo de produção em relação às usinas termoeletricas, além de ser considerada limpa e renovável (ANEEL, 2014).

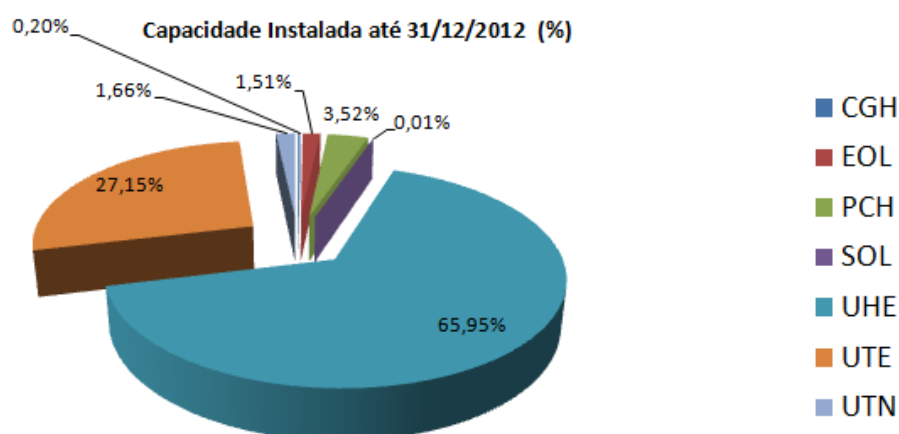


FIGURA 1 – CAPACIDADE ENERGÉTICA BRASILEIRA INSTALADA ATÉ 31 DE DEZEMBRO DE 2012

Legenda: CGH: Central Geradora Hidrelétrica; EOL: Energia Eólica; PCH: Pequenas Centrais Hidrelétricas; SOL: Energia Solar; UHE: Usina Hidrelétrica de Energia; UTE: Usina Termoeletrica de Energia; UTN: Usina Termonuclear.

Fonte: ANEEL (2014)

A bacia do Tocantins/Araguaia possui potencial de 28000 MW, dos quais 8535 MW são aproveitados pela usina hidrelétrica Tucuruí I e II, no Pará. A UHE Tucuruí é a responsável pela maior parte da energia produzida exclusivamente para o país (QUADRO 1), e está localizada a 400 Km de Belém (PA), no município de Tucuruí (FIGURA 2) (ANEEL, 2014).

NOME DA USINA	LOCALIZAÇÃO	CAPACIDADE DE PRODUÇÃO (MW)
Região Norte		
Tucuruí I e II	Rio Tocantins	8.370
Balbina	Rio Uatumã	250
Região Nordeste		
Moxotó	Rio São Francisco	439
Xingó	Rio São Francisco	3.162
Região sudeste		
Ilha Solteira	Rio Paraná	3.444
Porto Primavera	Rio Paraná	1.540
Região Sul		
Itaipu	Rio Paraná	12.600
Parigot de Souza	Rio Capivari	247
Região Centro-Oeste		
Ilha Solteira	Rio Paraná	3.230

QUADRO 1 – CENTRAIS GERADORAS DE ENERGIA ELÉTRICA NO BRASIL POR REGIÃO

Fonte: ANEEL (2014)



FIGURA 2 – USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ. (A) LOCALIZAÇÃO DA CIDADE DE TUCURUÍ (PA), (B) VISTA AÉREA DA USINA

Fonte: Google Earth (2014)

Em regiões de clima tropical e subtropical, a temperatura da água na superfície geralmente é maior que a temperatura das águas mais profundas ao longo de todo o ano. Isso dificulta a homogeneização da temperatura, e promove a estratificação das águas, resultando em uma superfície rica em oxigênio e com condições favoráveis ao desenvolvimento de biofilmes. Além disso, quando

vegetação está presente próxima à usina, pode ocorrer deposição de material orgânico, que se decompõe, agravando a situação (MACIEL FILHO, 1982).

3.2 Biofilmes

Em um ambiente aquático, os micro-organismos raramente se encontram em suspensão, mas formando agregados que se aderem a superfícies sólidas, culminando com a formação de um biofilme. Foi na forma de biofilme que foram visualizadas as primeiras bactérias em 1684, quando Antonie van Leuwenhoek desenvolveu o primeiro microscópio (JAIN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do biofilme é favorável para os micro-organismos por diversas razões. É um importante mecanismo de defesa contra falta de nutrientes, alterações de pH, choque osmótico, radicais livres, radiação, desidratação, agentes anti-microbianos, antibióticos e predadores. Ainda favorece a colonização de diversos nichos ecológicos, inclusive ambientes considerados inóspitos. Em animais, o biofilme ajuda na evasão contra o sistema imune; possibilita mutações e recombinações pela troca de material genético e apresenta comportamento cooperativo, através da expressão de genes e produção de substâncias que promovem a “comunicação” entre células, permitindo sua reação e adaptação ao ambiente (JEFFERSON, 2004).

O biofilme é composto predominantemente de água. Os micro-organismos contabilizam uma pequena porcentagem, cerca de 10% da massa seca, enquanto a matriz produzida por estas células totaliza os demais 90%. Tal matriz é formada por substâncias poliméricas extracelulares, chamadas de EPS (*Extracellular Polymeric Substances*), que consistem em polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e substâncias húmicas. As EPS, bem como os flagelos e fímbrias bacterianas, imobilizam as células, gerando uma estrutura tridimensional com “canais de água” que facilita adesão e coesão do biofilme, e a comunicação entre as células graças aos mecanismos de *quorum sensing* (FLEMMING; WINGERDER, 2010). *Quorum sensing* é a comunicação bacteriana realizada através de sinais químicos dependentes da densidade celular, que atuam alterando a expressão gênica de processos como formação de biofilme, virulência, conjugação e produção de metabólitos (KALIA, 2013).

A formação do biofilme ocorre em três etapas principais (FIGURA 3). Primeiramente, moléculas orgânicas e pequenas partículas se aderem à superfície por difusão, formando um filme que favorece a adesão de micro-organismos. Tal adesão é reversível, e depende fortemente das propriedades físico-químicas da bactéria e da superfície, como carga e hidrofobicidade. Nas bactérias, tais propriedades estão correlacionadas com estruturas como os lipopolissacarídeos da parede celular, fímbrias, flagelos e pili (NGUYEN; YANG; YUK, 2014). Com a adesão de mais células, e com o crescimento e proliferação das já aderidas, começa a produção de EPS, aumentando a força de interação e estabilizando o biofilme, protegendo-o contra estresse do ambiente (SREY; JAHID; HA, 2013). Com o tempo, partes do biofilme são liberadas, seja por atividade endógena ou por força cisalhante, podendo se aderir em outras superfícies formando novos biofilmes. Isso acontece para que a taxa de crescimento e a taxa de perda de massa atinjam um equilíbrio (ELVERS; LAPPIN-SCOTT, 2004).

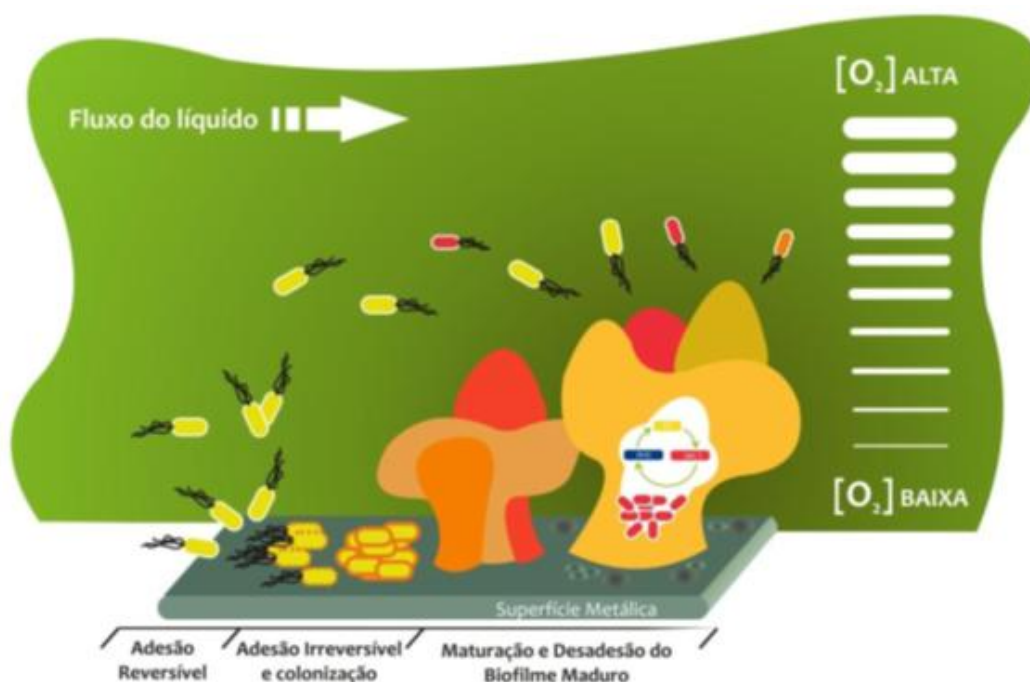


FIGURA 3 – ETAPAS PARA A FORMAÇÃO DO BIOFILME EM SUPERFÍCIES METÁLICAS
Fonte: MARANGONI (2010)

O crescimento do biofilme é limitado pela difusão de solutos. Na região mais próxima à superfície, a concentração de oxigênio é mais baixa, favorecendo o crescimento de micro-organismos anaeróbios. Na região mais externa, o oxigênio é

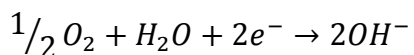
mais abundante, e é onde ocorre a multiplicação de bactérias aeróbias, fungos filamentosos e algas (JAIN *et al.*, 2007).

3.3 Biocorrosão

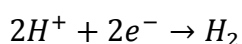
A corrosão é um processo eletroquímico, que ocorre naturalmente entre um metal e o ambiente em que está inserido. A superfície metálica atua como ânodo, doando elétrons para o cátodo e promovendo a redução do oxigênio externo, conforme as reações abaixo (ZARASVAND; RAI, 2014):



Reação no ânodo



Reação no cátodo em pH neutro ou alcalino



Reação no cátodo em pH ácido

Segundo dados do Departamento de Transportes dos Estados Unidos, os custos da corrosão são de 137,9 bilhões de dólares anuais, sendo aproximadamente 35% deste valor relacionado a utilidades (FIGURA 4), que inclui as usinas de geração energética e estações de tratamento de água e esgoto. Tais custos compreendem materiais e tempo disponibilizado para prevenção de corrosão, e a perda econômica devido à deterioração dos equipamentos e de possíveis problemas com o produto (FHWA, 2002).

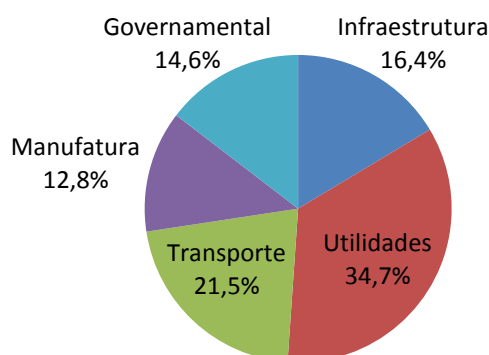


FIGURA 4 – CUSTO DA CORROSÃO POR CATEGORIAS
Fonte: FHWA (2002)

Os metais e as ligas metálicas, tais como cobre, aço carbono e aço inoxidável, também estão sujeitos à colonização por micro-organismos, o que pode influenciar nas propriedades físico-químicas, fenômeno denominado biocorrosão ou corrosão influenciada por micro-organismos (CIM). Dois mecanismos de ação da CIM são conhecidos: o primeiro envolve os metabólitos microbianos, tais como enzimas, ácidos orgânicos, amônio e sulfeto de hidrogênio, que atuam como aceptores intermediários de elétrons provenientes da superfície metálica, alterando o potencial da superfície biofilme/metál (BEECH; SUNNER, 2006). Já o segundo se deve a formação de células de concentração, que ocorrem devido à diferença de concentração entre dois pontos ao longo da superfície metálica. A variação na quantidade de íons ou de oxigênio favorece a reação anódica ao redor do metal, promovendo a corrosão (ZARASVAND; RAI, 2014).

As bactérias aeróbias atuam na colonização primária da superfície. Alguns gêneros envolvidos no processo de adesão são *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* e enterobactérias. Conforme a espessura do biofilme aumenta e o gradiente de oxigênio se desenvolve, bactérias anaeróbias ou aeróbias facultativas se aderem, como as bactérias redutoras de sulfato, bactérias oxidantes do ferro, bactérias oxidantes do enxofre e bactérias oxidantes do manganês. No biofilme maduro também podem aparecer micro-organismos eucariotos, tais como algas e fungos filamentosos, por exemplo, *Aspergillus* e *Penicillium* (BEECH; SUNNER, 2006; COETSER; CLOETE, 2005; KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003; MARANGONI, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

3.4 Controle microbiano

A melhor maneira de se evitar a formação do biofilme é prevenir a adesão microbiana, através de limpeza e desinfecção regular. As técnicas para controle são as mais variadas: incorporação de antimicrobianos à superfície; modificação das características físico-químicas da superfície; adição de substâncias com atividade antimicrobiana, tensoativos ou com propriedades dispersantes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Os biocidas são agentes que matam ou impedem o crescimento dos micro-organismos. Podem ser classificados em desinfetantes, que destroem as células

vivas, mas não necessariamente os esporos; preservantes, que evitam a biodeterioração dos materiais; esterilizantes químicos, que destroem todas as células vivas, incluindo os esporos; e agentes antimicrobianos, que matam ou suprimem o metabolismo dos micro-organismos (SONDOSSI, 2004).

De acordo com seu caráter químico, os biocidas podem ser classificados em oxidantes e não oxidantes. Os oxidantes atuam sobre constituintes básicos dos micro-organismos, sendo bastante efetivos. Por isso são muito utilizados, e dentre eles, podem ser citados os compostos a base de cloro, compostos a base de bromo e peróxido de oxigênio. Os não oxidantes são os compostos organo-sulfurados, isotiozolona, sais de cobre, aldeídos e sais quaternários de amônio. Estes compostos orgânicos agem na parede celular dos micro-organismos ou em seu metabolismo, e não depende da faixa de pH para atuar (VIDELA, 2002).

Os alvos celulares dos biocidas são a parede celular, a membrana citoplasmática, proteínas funcionais ou estruturais, DNA, RNA ou outros compostos citosólicos. Ou seja, a substância deve entrar na célula para que atinja o efeito desejado. O biocida mais adequado depende de suas características químicas e principalmente da morfologia das células a serem atacadas (BRIDIER *et al.*, 2011).

A resistência dos micro-organismos ao biocida no biofilme não é necessariamente decorrente de mutações genéticas, mas de adaptações fisiológicas das células ao ambiente multicelular promovida por mecanismos de *quorum sensing*. Por exemplo, lipopolissacarídeos mais longos favorecem a adesão das bactérias nas superfícies metálicas, enquanto que a produção de biosurfactantes diminui a coesão entre as células. Além disso, a rede intrínseca de polímeros extracelulares da matriz dificulta a difusão do biocida nas áreas mais internas do biofilme, diminuindo a eficácia (BRIDIER *et al.*, 2011; ZARASVAND; RAI, 2014).

A corrosão influenciada por micro-organismos é responsável por diminuição de mais de 5% da eficiência de trocadores de calor, atores cruciais no funcionamento das usinas hidrelétricas. Alguns biocidas comumente usados na indústria, em pontos de resfriamento de água de processo são: gás cloro, hipoclorito de sódio, brometo de sódio, glutaraldeído, peróxido de hidrogênio, ozônio e aminas. Entretanto, o uso excessivo destes biocidas pode causar a depleção do oxigênio dissolvido na água, levando a futuros danos ambientais. Assim, novas alternativas devem ser testadas para garantir a eficiência como antimicrobiano, mas

considerando a segurança do meio ambiente quando usado em larga escala (CRISTIANI; PERBONI, 2014).

3.4.1 MXD-100

O MXD-100 é um biocida que impede a proliferação microbiana pela atuação como desnaturante de proteínas. É um composto a base de taninos, produzido pela empresa Max Clean, que se mostrou eficiente no controle da formação de biofilmes. É de baixa toxicidade e biodegradável no meio ambiente (MAXCLEAN, 2007). Algumas usinas, como Itaipu (PR) e Nova Ponte (MG), já utilizam o MXD-100 para o controle de organismos invasores, apresentando bons resultados contra o *biofouling*. A Usina Tucuruí implantou a injeção do biocida, mas sem avaliar sua eficiência *in situ* (MÄDER NETTO, 2011).

3.4.2 Hidróxido de sódio

O aumento de pH pela injeção de hidróxido de sódio (NaOH) evita a complexação do ferro, diminuindo a deposição de matéria orgânica nos metais e, conseqüentemente, a corrosão influenciada por micro-organismos (LACTEC, 2004). Nguyen, Yang e Yuk (2014) demonstraram a importância do pH na formação do biofilme, principalmente na etapa de adesão inicial. As forças eletrostáticas necessárias para a adesão à superfície metálica são diminuídas devido à presença de radicais hidroxila livres.

Usinas como Governador Parigot de Souza (PR) e Governador José Richa (PR) utilizam o NaOH em seus sistemas, cujas instalações foram realizadas pelo Lactec (MÄDER NETTO, 2011).

3.4.3 Orobor

Orobor é um fertilizante agrícola com atividade inseticida que possui óleo essencial de laranja na sua formulação. Os óleos essenciais apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante, o que torna este produto uma excelente alternativa ao uso de agrotóxicos na agricultura (BAKKALI *et al.*, 2008). Prabuseenivasan *et al.* (2006) mostraram atividade antibacteriana *in vitro* do óleo

essencial da laranja, o qual apresentou efeito em diversas concentrações, até mesmo contra micro-organismos sabidamente presentes em biofilmes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

Por ser um produto oleoso, o mesmo é impróprio para utilização como controle de biofilmes em grande escala. Entretanto o Orobor foi estudado nesse trabalho apenas no intuito de compreender o efeito do óleo essencial de laranja.

3.4.4 Extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

A erva-mate é uma árvore originária da América do Sul, e há séculos suas folhas têm sido usadas pelos nativos devido às suas propriedades estimulantes. Além disso, também apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante. O extrato de *Ilex paraguariensis* contém xantinas, polifenóis, vitaminas A, B, C e E, e saponinas (BRACESCO *et al.*, 2011). Burris *et al.* (2011) demonstraram os efeitos do extrato aquoso em concentrações baixas no controle de bactérias Gram negativas e positivas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. O extrato também apresentou atividade fungicida contra *Malassezia furfur*, fungo causador da pitíriase, podendo ser utilizado como alternativa aos antifúngicos disponíveis atualmente (FILIP; DAVICINO; ANESINI, 2010).

3.4.5 Extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius*)

As folhas da aroeira são popularmente utilizadas no tratamento de candidíase, micoses e infecções por *E. coli* devido aos efeitos analgésicos (GOMES *et al.*, 2010). O efeito antimicrobiano se deve à presença de terpenos, mas o extrato também apresenta fenóis, flavonoides e antraquinonas (DE LIMA *et al.*, 2006). Moura-Costa *et al.* (2012) verificaram atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária do extrato aquoso do tronco da aroeira, com resultados superiores a de outras plantas da região do Paraná.

Uma vez que o biocida será adicionado no leito do rio, é de interesse estudar alternativas naturais para o controle da formação de biofilmes em sistemas de água. Considerando que as plantas produzem compostos com atividade biológica, e são

comumente utilizados como antimicrobianos no tratamento de doenças, os mesmos foram selecionados para teste neste trabalho.

3.5 Técnicas clássicas para identificação de micro-organismos

Os micro-organismos precisam ser identificados com propósitos práticos, por exemplo, a determinação do melhor biocida a ser utilizado para o tratamento da água. Esta identificação é feita a partir de esquemas de classificação baseados nas características específicas de determinados grupos, sendo que a maioria dos protocolos utilizados visa à identificação mais rápida (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Devido à rapidez na geração dos resultados, as análises de morfologia de colônia, microscopia óptica, cultivos em meios seletivos e testes bioquímicos são utilizadas rotineiramente em laboratório (SENG *et al.*, 2009). Meios de cultivo seletivos favorecem o crescimento apenas dos micro-organismos de interesse, facilitando a identificação. Dois exemplos de meios seletivos são o ágar Sabouraud, que devido ao pH mais ácido estimula o crescimento de fungos, e o ágar MacConkey, seletivo para bactérias Gram-negativas graças aos sais biliares e cristal violeta presentes em sua composição (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Especificamente para bactérias, o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* é a referência mais utilizada para identificação com base em critérios fenéticos, como morfologia, fisiologia e atividade bioquímica (BRYANT, 2004).

A análise mais prática é uma verificação morfológica de colônia quando cultivada em condições de crescimento específicas. Os critérios utilizados para a caracterização colonial são forma, tamanho, elevação, bordos, superfície, densidade, consistência e cor (KONEMAN *et al.*, 2008).

A análise microscópica de amostras bacterianas é dificultada em campo claro, devido ao índice de refração semelhante das células e o meio de montagem, o que requer o uso de corantes diferenciais (KONEMAN *et al.*, 2008). De acordo com o produto utilizado, diferentes organelas podem ser visualizadas, permitindo o estudo de características morfológicas tais como tamanho, flagelo e inclusões celulares (TRÜPER; SCHLEIFER, 2006).

A coloração de Gram, desenvolvida por Hans Christian Gram em 1884, é o primeiro passo para a identificação de bactérias. A técnica se baseia na constituição diferente da parede celular, sendo que as Gram-positivas tem a habilidade de reter o corante cristal violeta mesmo após tratamento com a solução etanol-acetona, e aparecem roxas ao microscópio. Enquanto isso, as Gram-negativas tem a parede degradada com etanol-acetona devido ao alto teor lipídico da mesma, e assumem a cor vermelha após a adição de safranina ou fucsina básica (KONEMAN et al., 2008).

A avaliação destas características permite uma identificação preliminar, e a partir disso, pode-se fazer testes quimiotaxonômicos adicionais para obter diferenciação mais detalhada.

A investigação das atividades metabólicas das bactérias *in vitro* é chamada de provas bioquímicas e servem para auxiliar o microbiologista a identificar grupos ou espécies de bactérias ou leveduras através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação das enzimas de um dado micro-organismo. Como muitas vezes um determinado micro-organismo possui um sistema enzimático específico, promovendo transformação bioquímica específica, as provas bioquímicas podem ser utilizadas na prática para a sua caracterização (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Nos casos de identificação de *Candida*, são comumente utilizados testes bioquímicos. Alguns sistemas de análise rápida são vendidos comercialmente, como o API 20C Aux System (*Analytab Products*), baseado na assimilação de carboidratos, e o CHROMagar (*CHROMagar Company*), que se utiliza da clivagem de substratos cromogênicos (NEPPELENBROEK et al., 2013).

A identificação de fungos é feita basicamente por duas maneiras. A primeira é a análise das características morfológicas macroscópicas, tais como micélio aéreo, crescimento, bordos e cor, no verso e reverso da placa. Já a segunda forma é a visualização do tamanho, formato e disposição das estruturas assexuadas através da técnica de microcultivo, descrita por Martha Kern e Kathleen Blevins em 1999. A técnica consiste em semear o fungo em um cubo de meio de camada alta, cobrir com uma lamínula, e visualizar ao microscópio óptico após 7 e 14 dias. Através do microcultivo também é possível determinar a estrutura das hifas, se são septadas, ramificadas ou pigmentadas, de forma a auxiliar na identificação fúngica (KONEMAN et al., 2008).

Pimentel *et al.* (2006) utilizaram a técnica de microcultivo para identificação de fungos isolados da soja sob diferentes condições ambientais. Diferentes gêneros foram identificados, como *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Scopulariopsis*.

3.6 Técnicas moleculares

A introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) promoveu um avanço significativo na identificação de micro-organismos. Espécies de difícil cultivo e outras que nem eram conhecidas passaram a ser detectadas em testes moleculares (PETTI, 2007). A análise fenotípica baseada em morfologia e características bioquímicas permite a identificação dos micro-organismos até o nível de gênero, em alguns casos podendo chegar à espécie. Já a biologia molecular oferece informações diretas do DNA, o que permite o estudo de filogenia e evolução (GLIENKE *et al.*, 2011).

A PCR foi descrita por Kary Mullis em 1983, com o intuito de amplificar pequenas amostras de DNA, permitindo seu uso para diversas aplicações: detecção de genes, sequenciamento de DNA, *fingerprinting*, análise de genomas, análise de expressão gênica, taxonomia, estudos de polimorfismo, diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias (KONEMAN *et al.*, 2008).

A técnica consiste em dois oligonucleotídeos sintéticos complementares às sequências opostas da região do DNA a ser amplificada. Estes iniciadores flanqueiam a região alvo, e devido à sua extremidade 3'-OH livre, permitem a elongação da cadeia através de uma enzima DNA polimerase termoestável e desoxirribonucleotídeos. O protocolo é feito em termociclador, e consiste em 30 a 35 ciclos com oscilação da temperatura. Primeiramente, ocorre o aumento da temperatura a aproximadamente 94°C para separação da dupla fita de DNA, ou desnaturação. Depois, a temperatura é reduzida para que ocorra a hibridação dos oligonucleotídeos com as fitas, o anelamento. Este valor varia conforme o par de iniciadores utilizados. Então segue o crescimento da cadeia, a cerca de 74°C, temperatura ideal para a DNA polimerase. O número de ciclos vai possibilitar que

amostras pequenas tenham, ao final da reação, mais de 1 milhão de cópias da região alvo (NELSON; COX, 2006, PALMER; PASZKO-KOLVA, 2004).

Apesar de eficiente, a PCR era restrita para alguns casos. Assim, a técnica sofreu algumas modificações que expandiu seu uso para inúmeros organismos. A RT-PCR é capaz de amplificar genomas de RNA devido a uma etapa extra na qual uma transcriptase reversa produz uma cópia de DNA a partir do RNA, que então passa pelas mesmas fases da PCR padrão. A PCR-multiplex permite que, em única reação, múltiplos pares de iniciadores atuem simultaneamente, amplificando diferentes genes ou o mesmo gene de diferentes espécies. Outra modificação da PCR padrão é a Nested-PCR, que visa aumentar a sensibilidade da reação. Neste protocolo, um conjunto de iniciadores é utilizado para amplificar uma região maior que a desejada e, em seguida, outro par que se anela mais internamente ao alvo é adicionado (KONEMAN *et al.*, 2008).

Outra evolução da PCR foi a capacidade de detectar os produtos amplificados em tempo real, o que foi possível com o uso de moléculas fluorogênicas e equipamentos que detectam este sinal sem interferir no processo. O SYBR Green é um corante que se liga inespecificamente ao sulco menor do DNA, sendo que quanto maior a fluorescência, maior o número de produtos amplificados. As sondas de hidrólise TaqMan são específicas, e baseiam-se na atividade exonuclease 5'-3' da DNA polimerase. Tais sondas se anelam a região alvo, e são clivadas quando a enzima passa por elas liberando um sinal do fluoróforo repórter ligado a extremidade 5'. Quando a clivagem não ocorre, o sinal do repórter é bloqueado pelo *quencher*, molécula ligada a extremidade 3' da sonda (GINZINGER, 2002).

O gene a ser estudado varia, mas tem como característica a constância de função, com segmentos comuns a várias espécies bacterianas ou fúngicas, e também regiões hipervariáveis que caracterizam as diferentes espécies, possibilitando sua comparação com bancos de dados adequados para posterior identificação (PETTI, 2007). No caso das bactérias, o gene mais comumente empregado é o 16S ribossomal. Lin *et al.* (2013) utilizaram esse gene para fazer a caracterização molecular de biofilmes extraídos de canos de PVC, de aço carbono e de ferro, e demonstrou que a variabilidade bacteriana é menor nos canos de PVC.

Entretanto, para alguns grupos, a identificação não atinge o nível de espécie devido às sequências idênticas, como é o caso do *Bacillus* e *Mycobacterium*. Assim, novos genes também podem ser usados, como *rpoB*, *tuf*, *gyrA* ou *gyrB* e *sodA*, que

codificam, respectivamente, a subunidade β da RNA polimerase, o fator de alongação Tu, a girase A ou B e a superóxido dismutase dependente de manganês (PETTI, 2007).

Uma vantagem desta técnica é a possibilidade de identificar micro-organismos não cultiváveis ou exigentes, como é o caso das bactérias oxidantes de ferro e bactérias redutoras de sulfato. Tischler et al. (2013) utilizaram, de forma satisfatória, iniciadores específicos do 16S rRNA para confirmar a presença de ferrobactérias nas águas de uma planta piloto na Alemanha. Daly, Sharp e McCarthy (2000) desenvolveram 6 pares de iniciadores 16S rRNA para detecção e identificação de bactérias redutoras de sulfato isoladas de aterros. Os mesmos iniciadores também se mostraram eficientes na detecção de bactérias isoladas a partir de corpos de prova metálicos, sendo uma ferramenta útil no estudo da biocorrosão (MARANGONI, 2013).

Para os fungos, a biologia molecular é vantajosa porque não exige esporulação para análise por microcultivo, o que muitas vezes é dificultado em condições laboratoriais. Os genes alvos mais utilizados são as regiões inter-espaçadoras ITS1 e ITS2, regiões variáveis localizadas internamente aos genes 18S, 5,8S e 28S rRNA. Por serem regiões com alta porcentagem de amplificação e de sucesso no sequenciamento, e por permitir a identificação de um grande grupo de fungos pela variação inter e intra-espécies, a região ITS foi selecionada como código de barras universal para o DNA de fungos (SCHOCH *et al.*, 2012). Mas, de forma análoga às bactérias, em alguns casos apenas este gene não é suficiente para identificação no nível de espécie. Assim, podem também ser usados os genes da β -tubulina, da calmodulina, da subunidade maior da RNA polimerase ou do fator de alongação α (CHIOTTA *et al.*, 2011).

3.7 Espectroscopia no infravermelho

Espectroscopia é o estudo da matéria utilizando radiação eletromagnética, através da análise dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Com a radiação, cada átomo ou molécula absorve, transmite e emite uma quantidade diferente de energia característico, criando um padrão de espectro único (BALL, 2001).

O espectro eletromagnético envolve as diversas intensidades da radiação eletromagnética, que estão divididas em bandas de acordo com a forma com que são produzidas ou detectadas (FIGURA 5). De modo geral, as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou luz visível, as vibracionais no infravermelho e as rotacionais na banda de micro-ondas (BALL, 2001).

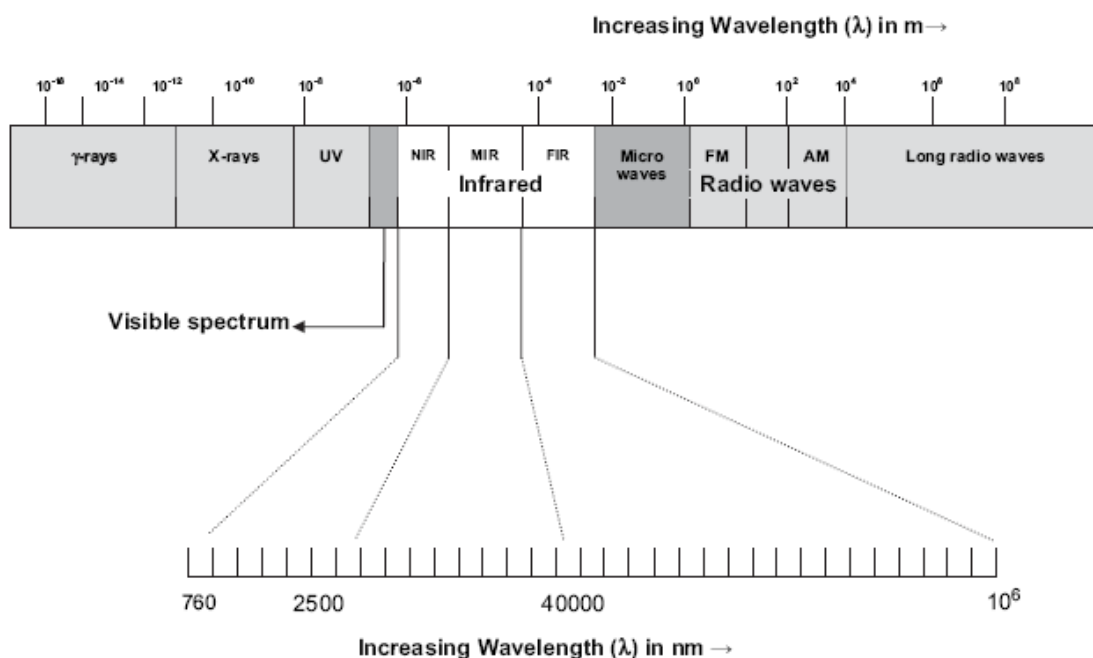


FIGURA 5 – ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

Fonte: SANTOS *et al.* (2010)

A banda do infravermelho está situada entre a luz visível e micro-ondas, e é originada a partir de uma emissão térmica de uma fonte de calor. É dividida de acordo com o número de onda (ν), ou seja, o número de ondas por centímetro: NIR, ou infravermelho próximo ($\nu = 10000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$); MIR, ou infravermelho médio ($\nu = 4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$); e FIR, ou infravermelho distante ($\nu = 200 - 10 \text{ cm}^{-1}$) (SANTOS *et al.*, 2010).

Apesar das técnicas clássicas e moleculares para a identificação de micro-organismos, têm sido desenvolvidas metodologias mais rápidas, baratas e precisas. A espectroscopia no infravermelho aparece como uma alternativa devido à sua rapidez, ausência de grande número de etapas prévias para preparo da amostra, grande quantidade de informação gerada e seu espectro *fingerprint*, ou seja, característico de determinado organismo (PREISNER; LOPES; MENEZES, 2008). Esta especificidade é derivada das frequências, intensidades e comprimentos de

onda que caracterizam grupos funcionais de moléculas de diferentes conformações. E o espectro obtido pode então ser comparado com um banco de dados, levando em consideração comprimentos de onda significativos para amostras biológicas (QUADRO 2) (BEEKES; LASCH; NAUMANN, 2007).

Região	Comprimento de onda (cm⁻¹)	Macromoléculas predominantes	Grupos funcionais
I	2996-3700	Vários	O-H, N-H
II	2800-2996	Lipídeos	C-H
III	1485-1800	Proteínas	Amida I e II
IV	1185-1485	Proteínas e lipídeos	CH ₂ , CH ₃
V	900-1185	Polissacarídeos	C-O-C, C-O-P

QUADRO 2 – COMPRIMENTOS DE ONDA UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO, COM SUAS RESPECTIVAS MOLÉCULAS DOMINANTES E GRUPOS FUNCIONAIS

Fonte: NAUMANN (2009)

A FT-IR (Espectroscopia no Infravermelho com a Transformada de Fourier) mostrou-se capaz de diferenciar e classificar taxonomicamente bactérias e fungos em nível de espécie e até mesmo de linhagens. Também pode ser usada na prospecção a partir de amostras ambientais (KIRSCHNER *et al.*, 2001; NGO-THI; KIRSCHNER; NAUMANN, 2003; TRALAMAZZA *et al.*, 2013). A técnica pode, inclusive, mostrar diferentes padrões de metabolismo devido a variações nos parâmetros de cultivo, como tempo de cultura, composição do meio e temperatura (RUBIO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2010).

O funcionamento de um equipamento de FT-IR se dá pela passagem de um feixe de infravermelho pela amostra com a posterior detecção, quantificação e registro dos dados gerados em um interferograma, gráfico de tempo versus intensidade de sinal. A transformada de Fourier sobrepõe os dados de diferentes comprimentos de onda e intensidade de absorção para gerar um espectro único (SOLOMONS; FRYHLE, 2005). Um algoritmo é utilizado para realizar as análises estatísticas multivariadas e obter as relações entre as amostras e variáveis estudadas.

Para analisar as amostras de modo eficaz, é importante escolher técnicas de medidas adequadas ao tipo de amostra e região da radiação que se quer utilizar. Diferentes materiais e solventes interferem menos de acordo com o tipo de comprimento de onda, tornando ideais para a leitura, uma vez que o objetivo é a amostra absorver a luz emitida (MISTRY, 2009).

Atualmente, o maior desafio no uso da espectroscopia no infravermelho para amostras biológicas é a presença de água. O pico de absorbância da água, que aparece em torno de 3500 cm^{-1} , é elevado e interfere significativamente no espectro de determinadas proteínas. Assim, o preparo da amostra deve ser feito de forma a minimizar a hidratação, exigindo uma padronização eficiente (BARTH; HARRIS, 2009).

Na metodologia de transmitância, o feixe de radiação é detectado após passar através da amostra. Amostras aquosas devem secar no cristal, formando um filme fino. Tal cristal deve ser feito de um material opticamente neutro, como seleneto de zinco (ZnSe) ou fluoreto de cálcio (CaF_2) (NAUMANN, 2000). As amostras sólidas são pulverizadas com algum sal inerte, como brometo de potássio (KBr), cloreto de potássio (KCl) ou cloreto de sódio (NaCl), e submetidas a alta pressão. Assim, o sal forma uma pastilha formada por uma matriz resistente (SCHMITT; FLEMMING, 1998).

Além da transmitância, outras técnicas utilizadas são a reflectância total atenuada (ATR) e a reflectância difusa (DRIFT). A ATR baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. Já na DRIFT, o feixe de infravermelho atinge a amostra, e é refletido, espalhado e transmitido. Uma parte refletida penetra difusamente em diferentes níveis da amostra e é então direcionada a detectores ópticos. A maior vantagem de trabalhar com a reflectância é a utilização de amostras sólidas, sem necessidade de muitas etapas de preparo. Entretanto, isso pode deixar a amostra sem superfície uniforme, o que pode dificultar a reprodutibilidade da técnica (GRIFFITHS; DE HASETH, 2007).

A quimiometria consiste na união de análises estatísticas multivariadas, modelagem matemática, informática e química analítica para o desenvolvimento e validação de técnicas. O objetivo é o desenvolvimento de um modelo matemático que represente as amostras quimicamente, e seja capaz de prever amostras futuras a partir de seus espectros (CÔCCO, 2008). A análise de componentes

principais (PCA – Principal Component Analysis) permite explorar os dados multivariáveis pela compactação dos mesmos por combinação linear. Já na regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – Partial Least-Squares Regression), a matriz de dados é decomposta de acordo com scores dados às variáveis, gerando um modelo de acordo com a identificação dada a cada amostra. Entretanto, por mais que técnicas estatísticas como PCA permitam uma avaliação mais prática da composição encontrada para a amostra, é fundamental o estudo e os testes de pré-tratamentos de dados, pois comumente erros de modelagem e análises ocorrem devido a fatores como escolha incorreta de amostras e variáveis. O uso do espectro inteiro para a separação de amostras pode dar importância para diferenças de composição irrelevantes para os objetivos desejados numa avaliação (GRIFFITHS; DE HASETH, 2007; KJELDAHL; BRO, 2010). Os pré-tratamentos a serem utilizados dependem da manipulação necessária para influenciar positivamente a modelagem. Por exemplo: a derivatização é interessante quando existem picos sobrepostos; o alisamento diminui a interferência de ruídos; e a correção de linha de base corrige a linha de base de todas as amostras, além de deixá-la horizontal (CÔCCO, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Os corpos de prova (CP) foram confeccionados a partir de chapas de aço conectadas a uma barra com rosca através de uma junção metálica. O conjunto foi então colocado em um tubo de PVC, e selado com resina epóxi (FIGURA 6).

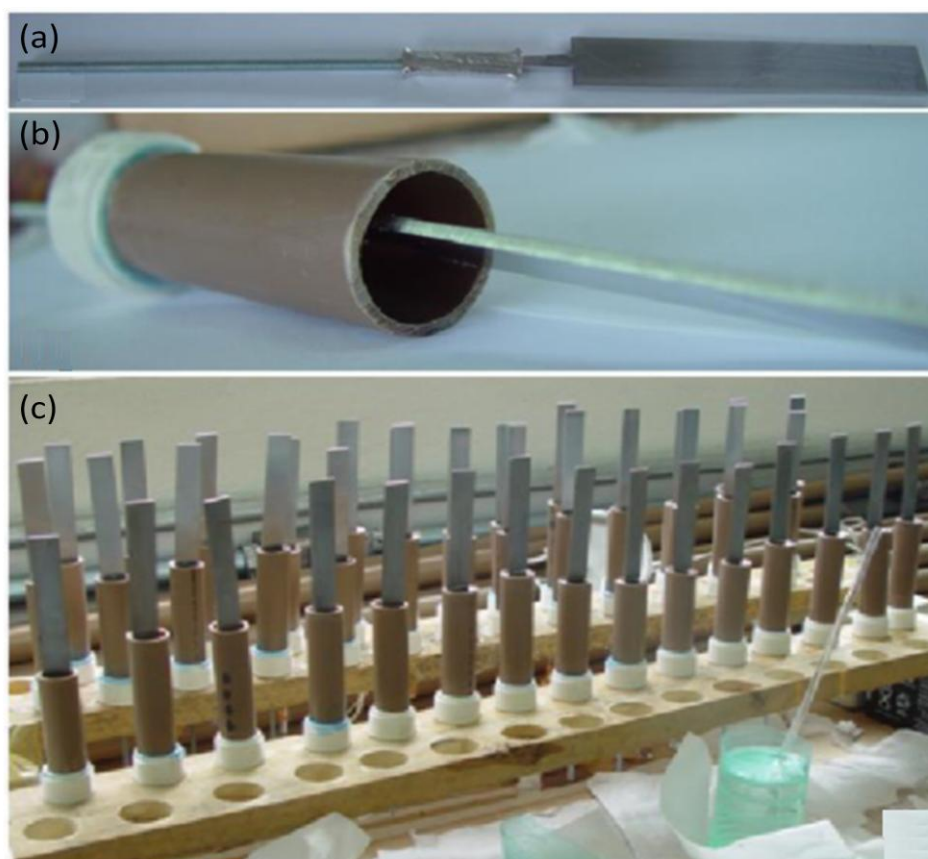


FIGURA 6 – CONFEÇÃO DOS CORPOS DE PROVA METÁLICOS. (A) CONJUNTO DE ELETRODO E BARRA DE ROSCA COM CONTATO METÁLICO. (B) CONJUNTO DE ELETRODO E BARRA DE ROSCA DENTRO DO TUBO DE PVC. (C) ARRANJO EXPERIMENTAL DA PREPARAÇÃO DE CORPOS DE PROVA

Fonte: Laboratório de Eletroquímica e Corrosão – Departamento de Materiais (LACTEC – UFPR) (2011)

Os CP foram instalados em caixas acrílicas presentes em quatro das doze máquinas da primeira casa de força da UHE-Tucuruí (FIGURA 7). Os CP são feitos de aço carbono 1020, aço inox 304L ou aço inox 316L, ligas metálicas comumente usadas na usina. Foram realizadas 6 coletas, nos meses de março, maio, julho,

setembro, dezembro de 2011, e março de 2012, em pontos antes (UGH6 e UGH13) e após a injeção do biocida (UGH9 e UGH15).

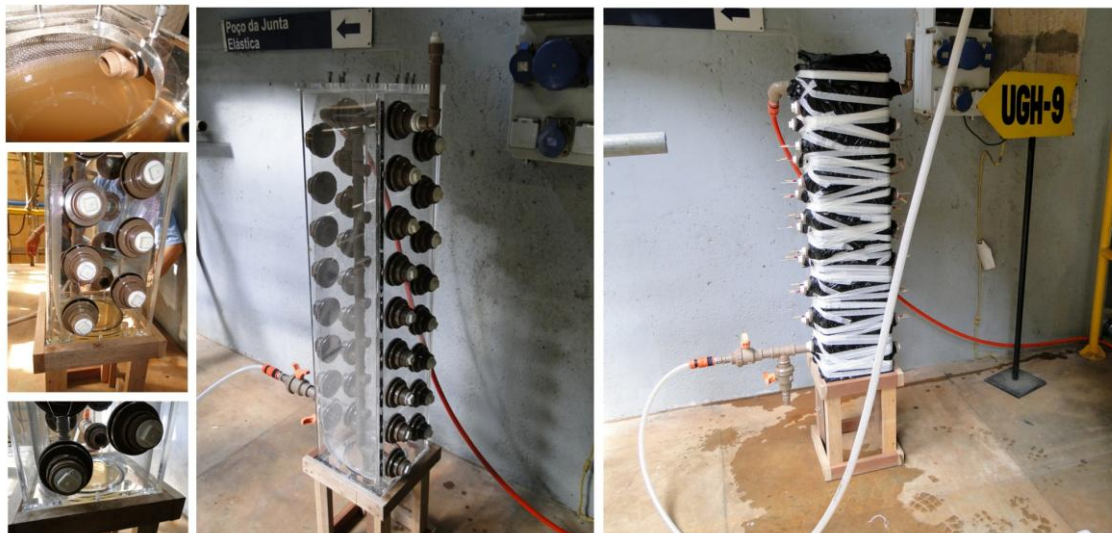


FIGURA 7 – ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DE BIOCORROSÃO INSTALADA NA MÁQUINA UGH9 DA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ

Fonte: Laboratório de Eletroquímica e Corrosão – Departamento de Materiais (LACTEC – UFPR) (2011)

4.2 Meios de cultivo

4.2.1 Meio seletivo para ferrobactérias Leathen-Mcintyre-Braley (adaptado de APHA; AWWA; WPCF, 1999)

Sulfato de amônio.....	0,15 g/L
Nitrato de cálcio.....	0,01 g/L
Fosfato de potássio dibásico.....	0,05 g/L
Sulfato de magnésio.....	0,5 g/L
Cloreto de potássio.....	0,05 g/L
Água destilada qsp.....	1000 mL

O meio foi autoclavado a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 10 mL de sulfato ferroso 10% esterilizado em filtro Millipore 20 µm. O pH foi ajustado para 3,5.

4.2.2 Meio específico para bactérias sulfato-redutoras (adaptado de APHA; AWWA; WPCF, 1999)

Glicose.....	0,15 g/L
Lactato de sódio.....	3,5 g/L
Extrato de carne.....	1,0 g/L
Peptona.....	2,0 g/L
Sulfato de sódio.....	1,5 g/L
Fosfato de potássio dibásico.....	0,5 g/L
Sulfato de magnésio.....	2,0 g/L
Cloreto de cálcio.....	0,1 g/L
Água destilada qsp.....	1000 mL

Solução 1:

Ascorbato de sódio.....	10 g/L
-------------------------	--------

Solução 2:

Sulfato ferroso amoniacal.....	39,2 g/L
--------------------------------	----------

O meio foi autoclavado a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Antes do uso, foram adicionadas ao meio as soluções 1 e 2 previamente esterilizadas em filtro Millipore 0,22 µm. O pH foi ajustado para 7,5.

4.2.3 Caldo Sabouraud

Dextrose.....	40,0 g/L
Peptona.....	10,0 g/L
Água destilada qsp.....	1000 mL

Para o preparo do ágar Sabouraud, o meio foi acrescido de ágar 15 g/L. Ambos foram esterilizados por autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

4.2.4 Ágar simples

Peptona.....	10,0 g/L
Cloreto de sódio.....	5,0 g/L
Extrato de carne.....	3,0 g/L
Ágar.....	5 g/L
Água destilada qsp.....	1000 mL

O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

4.2.5 Água peptonada

Peptona.....	10,0 g/L
Cloreto de sódio.....	5,0 g/L
Água destilada qsp.....	1000 mL

O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

4.2.6 NaCl 6,5%

<i>Tryptic soy case (Acumedia)</i>	30,0 g/L
Cloreto de sódio.....	65,0 g/L
Água destilada qsp.....	1000 mL

O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

4.3 Preparo de inóculo

O inóculo foi preparado raspando aproximadamente 16 cm² de tubérculo de corrosão de cada corpo de prova com lâmina devidamente esterilizada, e adicionando-o em 100 mL de solução salina NaCl 0,85% autoclavada. Quando necessário, diluições foram realizadas misturando 1 mL desta solução em 9 mL de solução salina 0,85%. Este inóculo foi utilizado para isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, isolamento de fungos, presença de bactérias oxidantes do ferro e presença de bactérias redutoras de sulfato.

4.4 Isolamento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas totais

Foram adicionados 100 µL do inóculo, diluído dez e cem vezes, em placas de Petri contendo ágar de soja (*Tryptic soy case* – Acumedia). A amostra foi homogeneizada por espalhamento em superfície com alça de Drigalski. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 30°C por três dias. Após este período, as colônias foram contadas para cálculo do número de unidades formadoras de colônias por área do corpo de prova.

4.5 Identificação de bactérias

A identificação foi feita por coloração de Gram (KONEMAN *et al.*, 2008) e pela utilização do meio seletivo MacConkey (*MacConkey* – Himedia). A partir dessa identificação inicial, provas bioquímicas adicionais (BUCHANAN; GIBBONS, 1974) foram selecionadas de acordo com protocolo sugerido pela ANVISA (2012). Nos casos de bactérias Gram-negativas, foram realizadas as seguintes provas: oxidase (Tiras de oxidase – Laborclin), fermentação da glicose, fermentação da lactose, produção de sulfeto de hidrogênio, produção de gás (Ágar tríplice açúcar ferro – Himedia), motilidade (Ágar simples – item 4.2.4), utilização do citrato (Ágar citrato de Simmons – Himedia), descarboxilação da lisina (Caldo lisina descarboxilase – Himedia), produção de indol (Água peptonada – item 4.2.5), produção de urease (*Urea broth* – Himedia), produção de fenilalanina desaminase (Ágar fenilalanina – Difco), produção de DNase (*DNase test Agar with toluidine blue* – Himedia) e vermelho de metila (Caldo glicose tamponado – Merck) para identificação de enterobactérias. Para as bactérias Gram-positivas foram incluídos os testes da catalase, oxidase (Tiras de oxidase – Laborclin), motilidade (Ágar simples – item 4.2.4), NaCl 6,5% (item 4.2.6), fermentação da glicose, fermentação da lactose, produção de sulfeto de hidrogênio e produção de gás (Ágar tríplice açúcar ferro – Himedia). Os resultados foram analisados após incubação em estufa a 30°C por 48 horas.

4.6 Presença de bactérias oxidantes de ferro

Foram adicionados 5 mL de inóculo em tubos de ensaio contendo meio seletivo Leathen-Mcintyre-Braley (item 4.2.1). Estes foram incubados a 30°C por 15 a 20 dias, e após o período, lâminas de coloração de Gram (KONEMAN *et al.*, 2008) foram confeccionadas.

A confirmação da presença de bactérias oxidantes de ferro se deu pela adição de 2 gotas de solução de ferrocianeto de potássio 1% em cada tubo após o período de incubação. A mudança de coloração do meio para azul intenso (Azul da Prússia) indica a presença de íon ferroso insolúvel, ou seja, confirma a presença de bactérias oxidantes.

4.7 Presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS)

O inóculo foi colocado em meio específico para bactérias sulfato-redutoras (item 4.2.2). Os tubos utilizados devem ter atmosfera interna reduzida de oxigênio, visto que as bactérias sulfato-redutoras são anaeróbias estritas. Para isso, os tubos foram totalmente preenchidos, e lacrados com tampa rosqueável e rolha de borracha para garantir a vedação do sistema (RODRIGUEZ-CAVALLINI; CRUZ, 1999). Após 50 dias de incubação a 30°C em estufa de anaerobiose com recirculação de gás carbono, a presença destas bactérias foi verificada pelo depósito de uma substância de coloração escura, o sulfeto ferroso.

4.8 Identificação de bactérias redutoras de sulfato

A caracterização das bactérias redutoras de sulfato foi realizada através da amplificação de genes específicos por PCR. O DNA total foi isolado da amostra inicial por meio do *kit Power Soil DNA (MoBio Labs)*. Os oligonucleotídeos iniciadores específicos estão apresentados no QUADRO 3, e são responsáveis por codificar RNAs 16S ribossomal.

A amplificação foi realizada em 13 µL de reação (tampão 1X (*Applied Biosystems*), cloreto de magnésio 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, iniciadores 0,8 mM cada,

Taq polimerase 0,1 U/μL (*Applied Biosystems*) e DNA 40 ng), sendo que cada par de iniciador foi amplificado em reações independentes. Foram realizados 30 ciclos, cujas temperaturas são: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento com temperatura dependente de cada par de iniciador por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e alongamento final a 72°C por 4 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (*Eppendorf, Hamburg, Germany*), e os fragmentos visualizados em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídeo.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Especificidade	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (bp)	Gêneros
	5' – 3'				
DFM140 DFM842	TAG MCY GGG ATA ACR SYK G ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC	Grupo 1	58	700	<i>Desulfotomaculum</i> sp.
DBB121 DBB1237	CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC	Grupo 2	66	1120	<i>Desulfobulbus</i> sp.
DBM169 DBM1006	CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG	Grupo 3	64	840	<i>Desulfobacterium</i> sp.
DBM127 DSB1273	GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T	Grupo 4	60	1150	<i>Desulfobacter</i> sp.
DCC305 DCC1165	GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC	Grupo 5	65	860	<i>Desulfovibrio</i> sp. <i>Desulfosarcina</i> sp. <i>Desulfococcus</i> sp. <i>Desulfonema</i> sp.
DSV230 DSV838	GRG YCY GCG TYY CAT TAG C SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC	Grupo 6	61	610	<i>Desulfovibrio</i> sp.

QUADRO 3 – SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DO rDNA 16S RECOMENDADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS BRS

Fonte: DALY, SHARP E MCCARTHY (2000)

Nota: As letras M, W, Y, K, R presentes nas sequências de nucleotídeos são referentes a bases degeneradas, que possuem complementaridade com mais de uma base nitrogenada. M pareia com adenina e citosina, W com adenina e timina, Y com bases pirimídicas, K com guanina e timina, e R com bases púricas.

4.9 Isolamento de fungos

O inóculo foi feito em placas contendo meio BDA (*Potato Dextrose Agar – Himedia*), e a homogeneização por espalhamento em superfície com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. (*Biochemical Demand of*

Oxygen) a 28°C por cinco dias, e após o período, as colônias foram contadas para cálculo do número de unidades formadoras de colônias por área do corpo de prova.

4.10 Identificação fúngica

A identificação foi feita pela observação de estruturas de reprodução e por sequenciamento de DNA. Foi realizada a técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999), que consiste em semear o fungo em um cubo de meio BDA alto e cobrir com uma lamínula. Após incubação em estufa B.O.D. a 28°C por 7 e 14 dias, as lamínulas foram retiradas para visualização das estruturas em microscópio óptico. Estas foram fixadas e coradas com lactofenol com azul de algodão 0,05%, e em seguida analisadas em aumento de 400X. A análise foi baseada em literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1972; DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001).

A extração de DNA dos isolados foi realizada conforme protocolo descrito por Badali *et al.* (2009), e sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. Então, a quantidade de DNA foi determinada utilizando o Espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific, California, USA*).

Gene	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Referência
		5' – 3'	
Região ITS-1, 5,8S e ITS-2	ITS-1 ITS-4	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	WHITE; BRUNS; TAYLOR, (1990)
β -tubulina (<i>benA</i>)	Bt2a Bt2b	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	GLASS; DONALDSON (1995)
Fator de alongação de tradução (<i>ef-1α</i>)	983F 2218R	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG	CHEN <i>et al.</i> (2011)
Subunidade II da RNA polimerase (<i>rpb2</i>)	fRPB2-5F bRPB2-7R	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG GAY TGR TTR TGR TCR GGG AAV GG	CHEN <i>et al.</i> (2011)

QUADRO 4 – SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

Nota: As letras M, W, Y, H, R presentes nas sequências de nucleotídeos são referentes a bases degeneradas, que possuem complementaridade com mais de uma base nitrogenada. M parecia com adenina e citosina, W com adenina e timina, Y com bases pirimídicas, H com adenina, timina e citosina, e R com bases púricas.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados são apresentadas no QUADRO 4.

Na primeira etapa, a amplificação foi realizada por PCR em 25 μ L de reação, sendo que as condições variam de acordo com o par de iniciador utilizado. As diferentes condições são mostradas no QUADRO 5.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (*Eppendorf, Hamburg, Germany*), e os fragmentos visualizados em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídeo.

Iniciadores		ITS-1 ITS-4	Bt2a Bt2b	983F 2218R	fRPB2-5F bRPB2-7R
Condições					
Concentração	Tampão	1 X	1 X	1 X	1 X
	MgCl ₂	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 Mm
	dNTP	0,3 mM	0,3 mM	0,2 mM	0,2 Mm
	Iniciadores	0,5 μ M	0,2 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M
	Taq polimerase	0,03 U/ μ L	0,03 U/ μ L	0,03 U/ μ L	0,03 U/ μ L
	DNA	40 ng	40 ng	20 ng	20 ng
Número de ciclos		30	35	35	35
Ciclagem	Desnaturação inicial	95°C / 10 minutos	94°C / 5 minutos	94°C / 5 minutos	94°C / 5 minutos
	Desnaturação	94°C / 30 segundos	94°C / 50 segundos	94°C / 50 segundos	94°C / 50 segundos
	Anelamento	58°C / 30 segundos	60°C / 50 segundos	59°C / 50 segundos	56,5°C / 50 segundos
	Extensão	72°C / 30 segundos	72°C / 1 minuto	72°C / 1 minuto	72°C / 1 minuto
	Extensão final	72°C / 4 minutos	72°C / 7 minutos	72°C / 7 minutos	72°C / 7 minutos

QUADRO 5 – CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RNA RIBOSSOMAL, PARTE DO GENE DA β -TUBULINA, FATOR DE ELONGAÇÃO DA TRADUÇÃO 1- α E SUBUNIDADE II DA RNA POLIMERASE

Fonte: WHITE, BRUNS E TAYLOR (1990); GLASS E DONALDSON (1995); CHEN et al. (2011); CHIOTTA et al. (2011).

Os produtos da PCR foram então purificados com polietilenoglicol. Foi adicionado 25 μ L de PEG 20% diluído em solução de NaCl 2,5 M, e incubado a 37°C

por 30 minutos. Em seguida, foi feita a centrifugação por 20 minutos a 16000 x g. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 62,5 µL de etanol 80% gelado. Após 1 minuto, os tubos foram centrifugados novamente a 16000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foi adicionado 62,5 µL de etanol absoluto gelado. Rapidamente o sobrenadante é descartado e o etanol evaporado em estufa a 60°C. O pellet resultante foi ressuspensionado em água ultrapura e deixado à temperatura ambiente por 24 horas.

A reação de sequenciamento foi a mesma para todos os iniciadores, em 10 µL de reação (0,5 µL de tampão para PCR (10x *Applied Biosystems*), 0,5 µL do iniciador (50 pmol), 0,5 µL do *Big Dye* (*Applied Biosystems*), 1 µL do produto de PCR (20 ng) e água ultrapura qsp 10 µL). Foram realizados 35 ciclos, cujas temperaturas são: desnaturação a 96°C por 10s, anelamento a 50°C por 5s, extensão a 60°C por 4min e alongamento a 60°C por 60s no final dos 35 ciclos.

Para precipitação, foi adicionado 40 µL de isopropanol 75% e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 25 minutos a 16000 x g. Após remoção do sobrenadante, foi adicionado 200 µL de etanol 70%, e centrifugado novamente a mesma velocidade por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o etanol evaporado em estufa a 60°C. O pellet resultante foi ressuspensionado em formamida Hi-Di, e passou por choque térmico. O sequenciamento foi realizado no equipamento *ABI 3500 automatic sequencer* (*Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*).

As sequências foram editadas utilizando-se o programa Staden (BONFIELD *et al.*, 2002). A seguir, foram alinhadas utilizando a máxima similaridade por meio do editor de sequência MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011). As análises foram realizadas utilizando o software BLASTn, disponível no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information website).

Nos casos em que houve discrepância nos resultados de microscopia e biologia molecular, foi feita microscopia eletrônica de varredura e análise filogenética para confirmação da espécie fúngica. Para o estudo filogenético, foram comparadas sequências dos gêneros identificados por morfologia e por biologia molecular, sendo o alinhamento feito no MEGA 5, a filogenia utilizando o programa PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2003), e a árvore resultante visualizada no TreeView (PAGE, 2002).

4.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Lamínulas de microcultivo foram retiradas após 14 dias de crescimento, e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (1:1) por duas horas em temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas com tampão cacodilato 3 vezes por 10 minutos para remoção do glutaraldeído. Em seguida foi realizada a desidratação em gradiente crescente de álcool (30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 2 vezes 100%), por 10 a 15 minutos. As lamínulas foram quebradas com o auxílio de pinça e bisturi para as etapas seguintes, que foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. O ponto crítico foi obtido com CPD-030 *Critical Point Dryer* (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e a metalização com ouro foi feita com SCD030 – Balzers Union FL 9496 Balzers (Balzers, Liechtenstein). A observação foi feita ao microscópio eletrônico JSM – 6360LV *Scanning Electron Microscope* (Jeol, Massachusetts, USA), com aumento máximo de 300000 X.

4.12 Padronização da técnica de espectroscopia no infravermelho

4.12.1 Bactérias

Para a identificação de bactérias foi utilizada a técnica de transmitância. Os isolados foram cultivados em triplicata em meio TSA (*Tryptic soy case – Acumedia*) por 48 horas a 37°C. Após este período, as colônias foram transferidas para tubos contendo diferentes solventes puros para teste: água, solução salina 0,85%, ciclohexano, óleo mineral, acetato de etila, clorofórmio, éter de petróleo, glicerina e acetonitrila. A água e a solução salina foram selecionadas por apresentar alta solubilidade de bactérias. Os demais solventes foram escolhidos por apresentarem pouca interferência no espectro da amostra. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos e então aplicado em cristal de seleneto de zinco (ZnSe) no equipamento FT-IR Nicolet 6700 (*Thermo Scientific, California, USA*) em espectro de absorbância entre 4000 e 900 cm^{-1} , com 64 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . Os dados gerados pelo software foram analisados pelo programa *The Unscrambler* 9.7 (CAMO ASA, 1997) para escolha da melhor metodologia de padronização.

4.12.2 Fungos

Para a identificação de fungos foram testados três diferentes metodologias de espectroscopia no infravermelho: Reflectância Total Atenuada (ATR), Reflectância Difusa (DRIFT) e transmitância.

Também foram testadas três metodologias de preparo de amostra. Na primeira, os isolados foram cultivados em caldo Sabouraud (item 4.2.3) por 7 dias a 28°C. Após este período, as amostras foram liofilizadas, e então trituradas com o auxílio de pistilo em um gral de porcelana e nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Na segunda, os fungos cultivados em caldo Sabouraud (item 4.2.3) por 7 dias a 28°C foram filtrados em papel filtro e secados em estufa a 60°C por 3 dias. As amostras foram então trituradas com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Na terceira metodologia, os isolados cresceram em ágar Sabouraud (item 4.2.3), e após 4 e 7 dias de cultivo os esporos e micélio aéreo foram coletados. Em todos os casos, as amostras foram trituradas com brometo de potássio espectroscópico (1:20) e prensadas com uma pressão de 10 toneladas, resultando em pastilhas translúcidas que foram aplicadas no equipamento Nicolet 6700 (*Thermo Scientific, California, USA*) em espectro de absorvância entre 4000 e 700 cm^{-1} , com 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} . Os dados gerados pelo software foram analisados pelo programa *The Unscrambler 9.7* (CAMO ASA, 1997) para escolha da melhor metodologia de padronização.

4.13 Avaliação da eficiência *in vitro* dos antimicrobianos MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*) no controle de micro-organismos isolados dos corpos de prova

Foi realizada a técnica de microdiluição para avaliação da eficiência dos biocidas contra bactérias, segundo norma M7-A6 da NCCLS (2003). Foram utilizadas bactérias pertencentes aos três gêneros que apareceram com maior frequência no isolamento. Após cultivo em meio TSA (*Tryptic soy case – Acumedia*) por 24 horas, suspensões bacterianas foram feitas em solução salina 0,85% até atingir escala McFarland de 0,5. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, as

suspensões foram diluídas em caldo Mueller Hinton (*Mueller Hinton Broth – Himedia*), e incubadas com os antimicrobianos MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e extratos de erva-mate e aroeira em três concentrações em testes independentes. As bactérias foram testadas isoladamente e em um pool, sendo a concentração final 10^6 UFC/mL em todos os testes. Os antibióticos vancomicina 0,1 mg/mL e gentamicina 0,1 mg/mL foram utilizados como controle positivo. A placa foi incubada a 35°C por 20 horas, e a leitura da mesma foi realizada em espectrofotômetro Epoch (*BioTek, Winooski, USA*) a 600 nm.

Para a avaliação dos biocidas contra fungos filamentosos, foi utilizada a técnica de microdiluição, norma M38-A da NCCLS (2002). Um exemplar do gênero fúngico que apareceu com maior frequência no isolamento foi cultivado em meio BDA (*Potato Dextrose Agar – Himedia*) por 7 dias. Uma suspensão foi preparada em solução salina 0,85% acrescida de Tween 20 para dispersão dos esporos. Após agitação por 15 segundos, foi feita a contagem do número de esporos, que foram inoculados em uma placa de microtitulação de 96 poços na concentração final de 10^5 esporos/mL. Juntamente, foi adicionado o meio RPMI (*RPMI 1640 pH 7,2 – Gibco*) e os antimicrobianos MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e extratos de erva-mate e aroeira em três concentrações em testes independentes. O antifúngico nistatina 1,25 mg/mL foi utilizado como controle positivo. A placa foi incubada a 35°C por 48 horas, e a leitura da mesma foi realizada em espectrofotômetro Epoch (*BioTek, Winooski, USA*) a 600 nm.

4.14 Análise estatística

A análise estatística dos dados de contagem direta foi realizada em delineamento inteiramente casualizado. Os mesmos foram transformados com $\log(x+2)$. A análise de variância (ANOVA) foi realizada ao nível de 5% de probabilidade e quando necessário, um teste de médias (Teste de Scott-Knott) foi empregado. O programa utilizado foi o ASSISTAT 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Corpos de prova

A TABELA 1 apresenta os corpos de prova coletados, bem como sua localização e tempo de exposição.

TABELA 1 – RELAÇÃO DE CORPOS DE PROVA COLETADOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUI, IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS, TEMPO DE EXPOSIÇÃO E DATA DE COLETA

Coleta	Código	Metal	Localização	Característica	Tempo de exposição	Data da coleta
1	AC6	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	1 semana	mar/2011
1	AC13	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após gerador	1 semana	mar/2011
1	AX21	Aço inox 304L	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	1 semana	mar/2011
1	AX46	Aço inox 304L	Máquina 6	Após gerador	1 semana	mar/2011
2	AC15	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	9 semanas	mai/2011
2	AC45	Aço carbono 1020	Máquina 15	Antes do trocador de calor do transformador	9 semanas	mai/2011
2	AC48	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após gerador	9 semanas	mai/2011
2	AX44	Aço inox 304L	Máquina 6	Após gerador	9 semanas	mai/2011
3	AC11	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	17 semanas	jul/2011
3	AC16	Aço carbono 1020	Máquina 15	Antes do trocador de calor do transformador	17 semanas	jul/2011
3	AC21	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após gerador	17 semanas	jul/2011
3	AX16	Aço inox 304L	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	17 semanas	jul/2011
3	AX47	Aço inox 304L	Máquina 6	Após gerador	17 semanas	jul/2011
4	AC7	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após gerador	18 semanas	set/2011
4	AC19	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	18 semanas	set/2011
4	AC24	Aço carbono 1020	Máquina 15	Antes do trocador de calor do transformador	25 semanas	set/2011
4	AL2	Aço inox 316L	Máquina 6	Após gerador	25 semanas	set/2011

4	AL14	Aço inox 316L	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de cloro	25 semanas	set/2011
5	AC38	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após regulador de velocidade	41 semanas	dez/2011
5	AC40	Aço carbono 1020	Máquina 9	Após regulador de velocidade	41 semanas	dez/2011
6	AC51	Aço carbono 1020	Máquina 13	Após gerador	13 semanas	mar/2012
6	AC58	Aço carbono 1020	Máquina 9	Após regulador de velocidade	13 semanas	mar/2012
6	AC62	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após regulador de velocidade	13 semanas	mar/2012
6	AC71	Aço carbono 1020	Máquina 15	Após gerador	13 semanas	mar/2012

Fonte: O autor (2012)

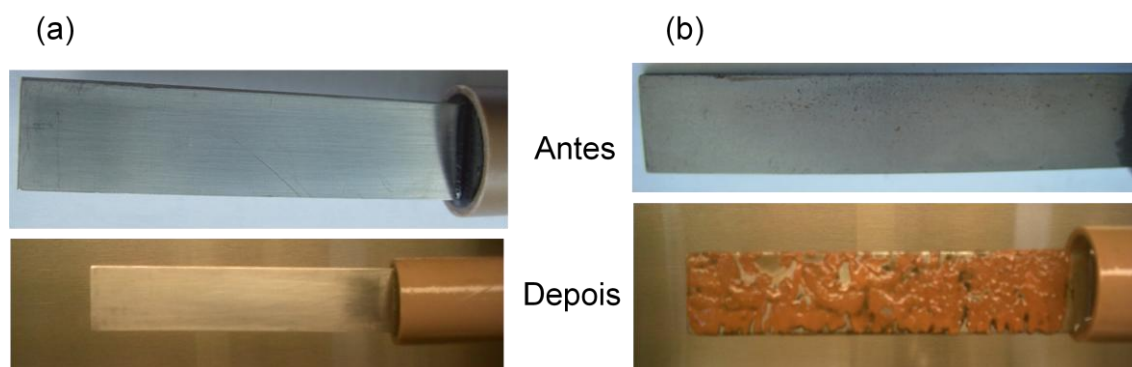


FIGURA 8 – CORPOS DE PROVA ANTES E DEPOIS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE UMA SEMANA ÀS ÁGUAS DA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ. (A) LIGA DE AÇO INOX AX46; (B) LIGA DE AÇO CARBONO AC6

Fonte: O autor (2011)

Na FIGURA 8 estão os corpos de prova após o tempo de exposição de 1 semana. Nas ligas de aço carbono, é possível ver o tubérculo de corrosão nitidamente. Já nos CPs de aço inox, apesar do tubérculo não ser visível, ainda foi possível isolar micro-organismos para caracterização. Dados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Pillay e Lin (2013) e Wesley *et al.* (2013). Isso ocorre porque o aço inoxidável tem pelo menos 10% de cromo em sua composição, quantidade suficiente para reagir com o oxigênio do meio externo ao invés do metal. Assim, o óxido de cromo formado se adere como uma película protetora que limita o acesso de oxigênio às camadas internas do metal, diminuindo a corrosão (CINDRA FONSECA *et al.*, 2012). Entretanto, é sabido que taxa de corrosão não está diretamente relacionada com a espessura do biofilme ou a quantidade de micro-

organismos, mas sim aos metabólitos produzidos por eles (CRISTIANI; PERBONI, 2014; ZARASVAND; RAI, 2014).

5.2 Contagem de bactérias totais e fungos

A contagem de micro-organismos em unidades formadoras de colônia por metro quadrado (UFC/m²) é apresentada na TABELA 2 e nos GRÁFICOS 1 e 2. Para chegar a estes valores, foi feita a média dos dados em triplicata da contagem. Levando em consideração que foram inoculados 100 µL da solução inicial, de volume total de 100 mL, obtém-se um fator de conversão de 1000. A média foi então multiplicada pelo fator de conversão e dividida pela área da liga, para dar o resultado em UFC/m².

TABELA 2 – CONTAGEM DE BACTÉRIAS TOTAIS E FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA TUCURUÍ

Coleta	Código	Área da liga (m ²)	Bactérias totais (UFC/m ²)	Fungos (UFC/m ²)
1	AC6	0,001602	6,24E+06	2,87E+07
1	AC13	0,001638	1,55E+07	3,66E+07
1	AX21	0,001602	1,36E+08	1,72E+07
1	AX46	0,001568	2,98E+06	3,49E+07
2	AC15	0,001638	3,46E+07	2,20E+06
2	AC45	0,001602	2,81E+07	2,25E+06
2	AC48	0,001602	4,24E+07	3,75E+06
2	AX44	0,001530	7,84E+06	1,96E+06
3	AC11	0,001638	9,35E+07	2,44E+05
3	AC16	0,001476	1,35E+08	9,49E+05
3	AC21	0,001458	7,04E+07	1,78E+06
3	AX16	0,001620	4,78E+07	2,47E+05
3	AX47	0,001674	5,03E+07	1,19E+05
4	AC7	0,001602	3,75E+08	1,12E+06
4	AC19	0,001620	3,70E+07	7,41E+05
4	AC24	0,001476	4,07E+07	2,85E+06
4	AL2	0,001602	2,43E+09	1,02E+07
4	AL14	0,001512	0,00E+00	5,95E+05

5	AC38	0,001606	2,09E+07	3,10E+07
5	AC40	0,001602	9,00E+07	7,01E+07
6	AC51	0,001602	2,64E+09	5,24E+06
6	AC58	0,001602	7,57E+07	1,55E+07
6	AC62	0,001602	2,16E+08	6,44E+06
6	AC71	0,001602	6,74E+08	4,35E+07

Fonte: O autor (2012)

De maneira geral, foi verificado que houve maior quantidade tanto de bactérias quanto de fungos nas ligas de aço carbono em relação às ligas de aço inox. Entretanto, salienta-se que a quantidade de micro-organismos não está diretamente relacionada à variabilidade microbiana nem à taxa de corrosão (CRISTIANI; PERBONI, 2014; ZARASVAND; RAI, 2014). Além disso, os GRÁFICOS 1 e 2 mostram, respectivamente para bactérias e fungos, que tal variação de valores de contagem entre as ligas não foi estatisticamente diferente (APÊNDICES 1 e 2). Esses dados corroboram com os obtidos por Wesley *et al.* (2013), que demonstraram que a contagem de micro-organismos entre as ligas metálicas de diferentes composições varia, sendo levemente superior no aço carbono. Foram $4,88\text{E}+6$ UFC/cm² contra $3,5\text{E}+6$ UFC/cm² no aço inox, ou seja, não são estatisticamente diferentes. A contagem de micro-organismos também não variou conforme o tempo de exposição. Provavelmente, o biofilme atingiu o equilíbrio entre taxa de perda de massa e taxa de crescimento em um período inferior a 1 semana, quando foi analisado o primeiro corpo de prova.

Os GRÁFICOS 1 e 2 também apresentam a vazão do rio Tocantins no período das coletas (ANA, 2012). Quando a chuva é mais escassa, a vazão bruta do rio diminui, e nesses períodos foi possível verificar que a contagem de micro-organismos chegou a ser até uma unidade logarítmica menor do que nas épocas de maior vazão. Infelizmente, não é possível afirmar se isso significa que em menores vazões a formação de biofilme é diminuída ou se ocorreu problemas durante o isolamento, uma vez que isso exigiria novas coletas no mesmo período para estudar a sazonalidade. Porém, tais dados diferem dos apresentados por Boulêtreau *et al.* (2011) e Osorio *et al.* (2014), que mostram que o aumento do fluxo de água diminui a densidade celular no biofilme. Isso se deve ao fato que o fluxo turbulento atua como uma vassoura, espalhando as células aderidas ao biofilme.

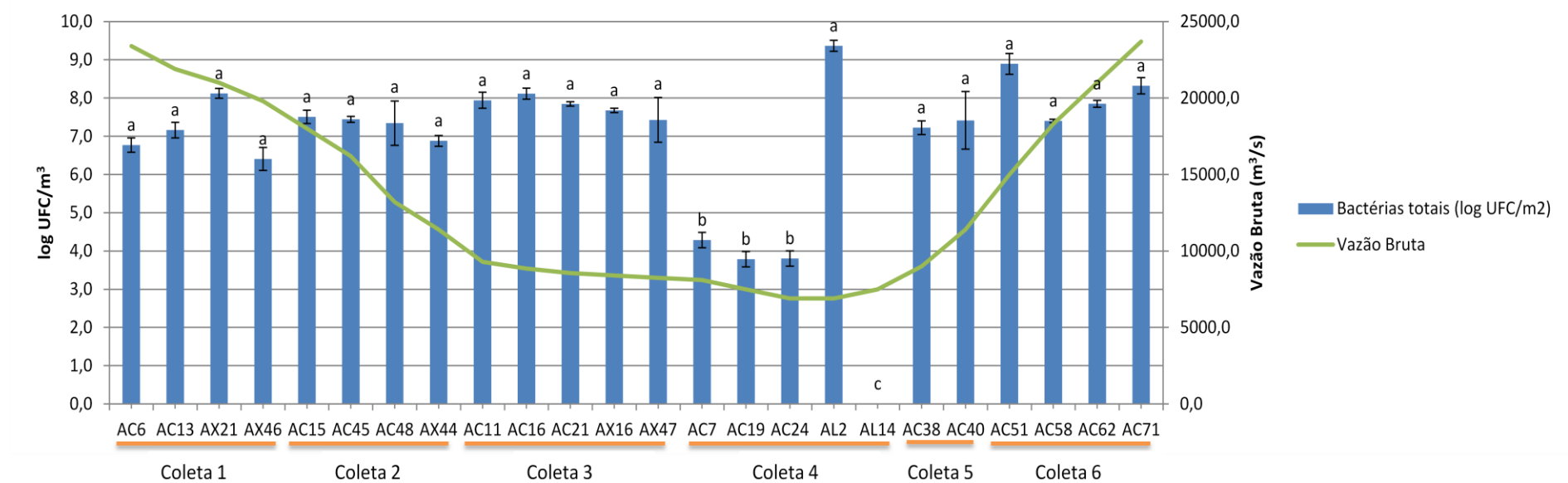


GRÁFICO 1 – CONTAGEM BACTERIANA E VAZÃO BRUTA DO RIO TOCANTINS NO PERÍODO DAS COLETAS

Nota: Análise estatística pelo teste de Scott-Knott (com probabilidade ao nível de 5%). Amostras com letras iguais apresentam igualdade estatística.

Fonte: O autor (2012)

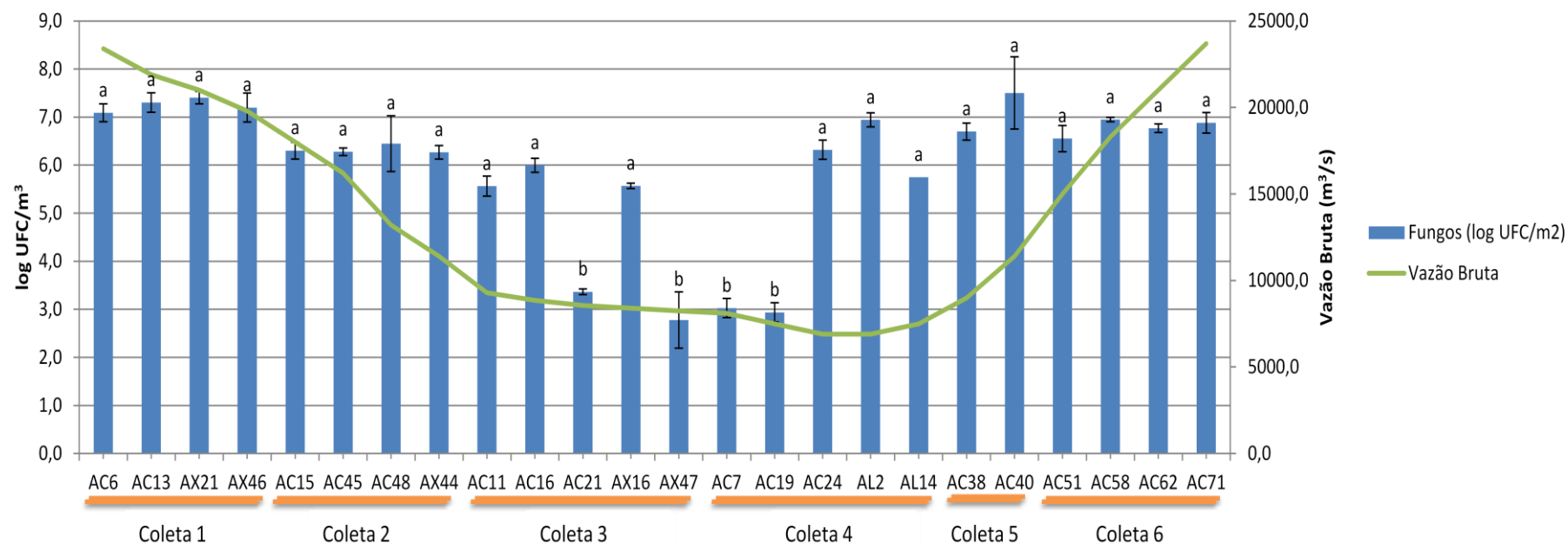


GRÁFICO 2 – CONTAGEM FÚNGICA E VAZÃO BRUTA DO RIO TOCANTINS NO PERÍODO DAS COLETAS

Nota: Análise estatística pelo teste de Scott-Knott (com probabilidade ao nível de 5%). Amostras com letras iguais apresentam igualdade estatística.

Fonte: O autor (2012)

5.3 Identificação de bactérias

A variabilidade bacteriana foi observada nas diferentes morfologias encontradas, como bacilos Gram-positivos e Gram-negativos, cocobacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos e bactérias filamentosas Gram-negativas (FIGURA 9). No total, foram 358 isolados bacterianos, sendo 36 bactérias da coleta 1, 113 da coleta 2, 101 da coleta 3, 42 da coleta 4, 37 da coleta 5 e 29 da coleta 6.

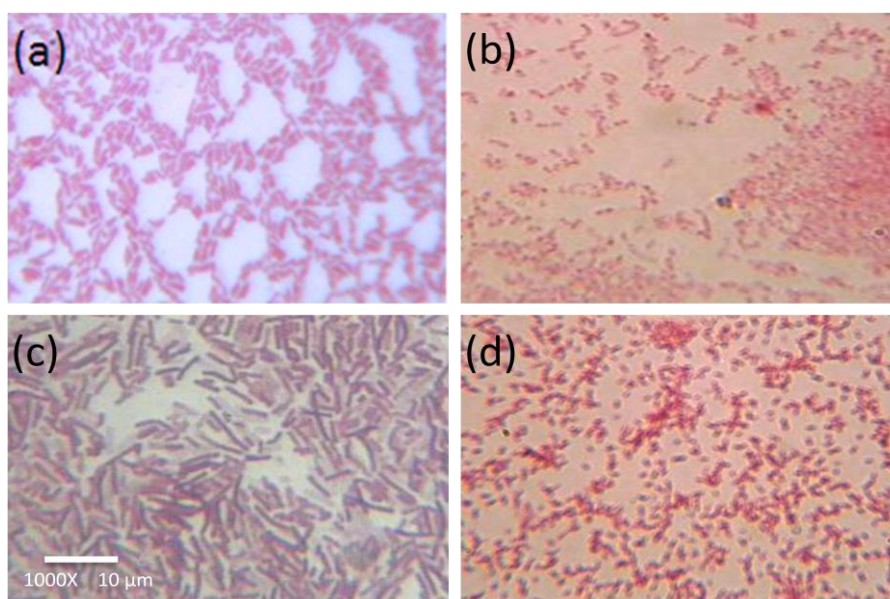


FIGURA 9 – ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ COLORADOS COM GRAM. (A) BACILOS GRAM-NEGATIVOS, (B) COCOS GRAM-NEGATIVOS, (C) BACILOS GRAM-POSITIVOS, (D) COCOS GRAM-POSITIVOS. AUMENTO DE 1000X

Fonte: O autor (2012)

Aproximadamente 52% das bactérias isoladas são Gram-positivas, sendo 74% pertencentes ao gênero *Bacillus* (GRÁFICO 3). O predomínio deste gênero também foi verificado em outros trabalhos, após isolamento a partir de corpos de prova de aço inox e aço carbono (MARANGONI et al., 2013; PILLAY; LIN, 2013; RAJASEKAR et al., 2010). As bactérias Gram-positivas, especialmente as do filo Firmicutes, no qual o gênero *Bacillus* está inserido, estão ativamente envolvidas na colonização e corrosão de materiais metálicos. Tais bactérias foram descritas como oxidantes do manganês e redutoras do

ferro, graças à produção de ácidos orgânicos que aceleram a corrosão (PILLAY; LIN, 2013).

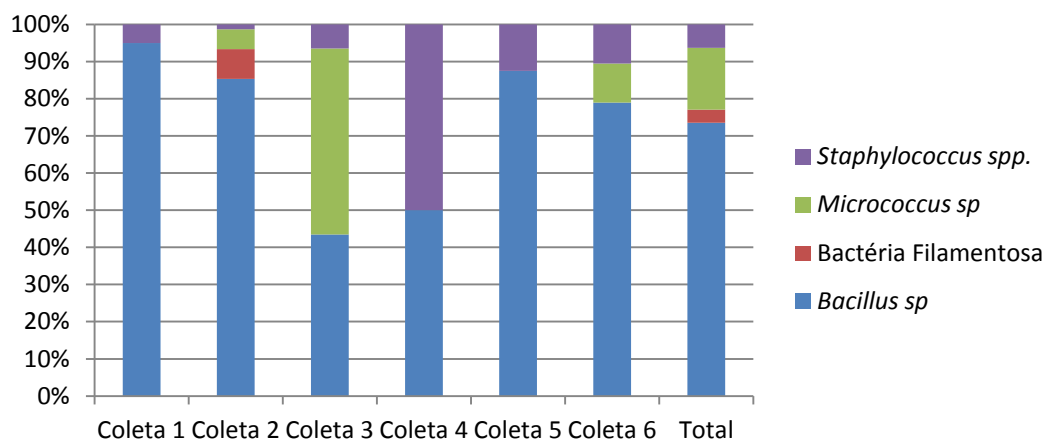


GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ EM CADA COLETA E NO TOTAL

Fonte: O autor (2012)

Após identificação bioquímica das bactérias Gram-negativas, obteve-se o perfil bacteriano apresentado no GRÁFICO 4. As bactérias que apareceram com maior frequência são *Citrobacter* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Acinetobacter* sp., com 17%, 17%, 15%, 14% e 11%, respectivamente. Entretanto, também foram identificados os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Yersinia*. Tais bactérias fazem parte da classe Gammaproteobacteria, comumente encontrada em biofilmes causadores de corrosão influenciada por micro-organismos (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2013; MARANGONI *et al.*, 2013; PILLAY; LIN, 2013; RAJASEKAR *et al.*, 2010). Aliadas às bactérias Gram-positivas, estes gêneros são importantes no processo de adesão inicial e colonização do biofilme através da produção de EPS e liberação de moléculas de *quorum sensing*, além de favorecer o processo corrosivo graças a redução de nitrato e à criação células de concentração (COETSER; CLOETE, 2005; JAN-ROBLERO *et al.*, 2004; PILLAY; LIN, 2013; SREY; JAHID; HA, 2013).

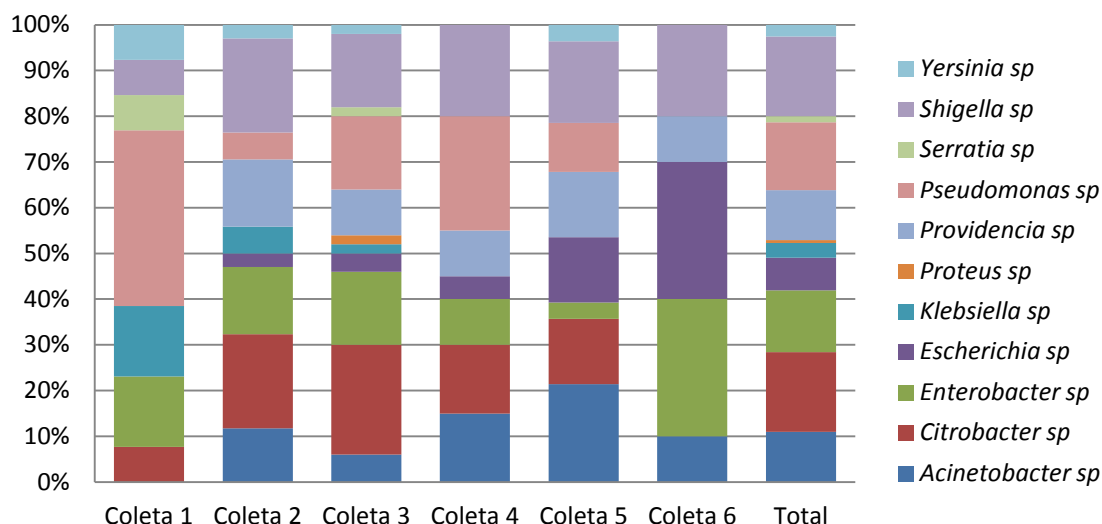


GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ EM CADA COLETA E NO TOTAL

Fonte: O autor (2012)

5.4 Presença de bactérias oxidantes de ferro

A TABELA 3 apresenta os resultados de presença ou ausência de bactérias oxidantes de ferro após cultivo em meio seletivo Leathen-Mcintyre-Braley. Após a adição da solução de ferrocianeto de potássio 1%, houve aparecimento da coloração azul intenso comprovando a presença desse grupo em aproximadamente 42% das amostras. As bactérias oxidantes de ferro foram encontradas tanto em ligas de aço carbono como nas de aço inox.

TABELA 3 – DETECÇÃO DE BACTÉRIAS OXIDANTES DE FERRO ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ, APÓS CULTIVO EM MEIO SELETIVO LEATHEN-MCINTYRE-BRALEY POR 20 DIAS A 30°C

Coleta	Código	Resultado
1	AC6	Não detectável
1	AC13	Não detectável
1	AX21	Não detectável
1	AX46	Não detectável
2	AC15	Não detectável
2	AC45	Positivo
2	AC48	Não detectável
2	AX44	Não detectável
3	AC11	Positivo
3	AC16	Positivo
3	AC21	Positivo
3	AX16	Positivo
3	AX47	Positivo
4	AC7	Positivo
4	AC19	Positivo
4	AC24	Positivo
4	AL2	Não detectável
4	AL14	Positivo
5	AC38	Não detectável
5	AC40	Não detectável
6	AC51	Não detectável
6	AC58	Não detectável
6	AC62	Não detectável
6	AC71	Não detectável

Fonte: O autor (2012)

Após coloração, bactérias filamentosas Gram-negativas foram observadas nas amostras positivas. O aspecto helicoidal apresentado na FIGURA 10, por exemplo, é característico de bactérias do gênero *Gallionella*, principal ferrobactéria envolvida no processo de corrosão microbiana (PILLAY;

LIN, 2013). Resultados falsos negativos após adição de ferrocianeto de potássio podem ter ocorrido devido ao fato de que tal bactéria tem preferência por meios neutros, e, portanto, é de difícil isolamento a partir do meio ácido Leathen-Mcintyre-Braley (TISCHLER *et al.*, 2013).

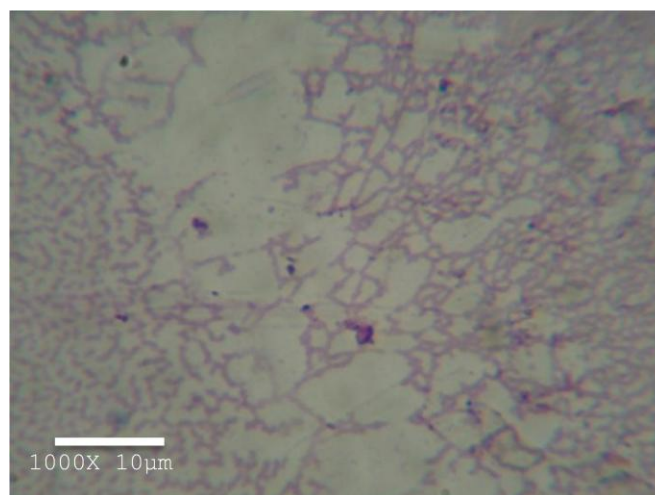


FIGURA 10 – BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA COM CARACTERÍSTICA FILAMENTOSA CORADA COM GRAM. AUMENTO DE 1000X
Fonte: O autor (2012)

As bactérias oxidantes de ferro não atuam no processo de corrosão diretamente, mas reduzindo o íon férrico a íon ferroso solúvel. O óxido férrico é um dos componentes que protegem a superfície metálica, e quando reduzido, permite a corrosão provocada por outros micro-organismos (COETSER; CLOETE, 2005).

5.5 Presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS)

As análises após cultivo em meio específico para bactérias sulfato-redutoras obtiveram resultados positivos em 29% das amostras. Entretanto, após análise por PCR o valor aumentou para 62,5% (TABELA 4). Essa variação se deve à baixa sensibilidade da análise microbiológica, e ao método de cultivo das bactérias, que exige condições anaeróbias estritas, inerentes a todos os meios para isolamento de BRS, e que nem sempre são possíveis de obter. A biologia molecular entra nesse contexto, permitindo o estudo de

ocorrência e distribuição de bactérias exigentes sem a necessidade de cultivo laborioso (DALY; SHARP; MCCARTHY, 2000).

TABELA 4 – DETECÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ, APÓS CULTIVO EM MEIO ESPECÍFICO POR 50 DIAS A 30°C EM ESTUFA DE ANAEROBIOSE, E APÓS PCR ESPECÍFICA

Coleta	Código	Resultado microbiológico	Resultado biologia molecular
1	AC6	Não detectável	Não detectável
1	AC13	Não detectável	Não detectável
1	AX21	Não detectável	Não detectável
1	AX46	Não detectável	Não detectável
2	AC15	Não detectável	Positivo
2	AC45	Não detectável	Positivo
2	AC48	Não detectável	Positivo
2	AX44	Não detectável	Positivo
3	AC11	Positivo	Positivo
3	AC16	Não detectável	Positivo
3	AC21	Positivo	Positivo
3	AX16	Não detectável	Positivo
3	AX47	Não detectável	Positivo
4	AC7	Não detectável	Não detectável
4	AC19	Positivo	Positivo
4	AC24	Positivo	Positivo
4	AL2	Não detectável	Não detectável
4	AL14	Não detectável	Não detectável
5	AC38	Positivo	Positivo
5	AC40	Positivo	Positivo
6	AC51	Não detectável	Positivo
6	AC58	Não detectável	Não detectável
6	AC62	Positivo	Positivo
6	AC71	Não detectável	Não detectável

Fonte: O autor (2012)

Após PCR, os produtos de amplificação visualizados em gel de agarose (FIGURA 11) foram positivos para os grupos 2 (*Desulfobulbus* sp.), 5 (*Desulfovibrio* sp., *Desulfosarcina* sp., *Desulfococcus* sp. e *Desulfonema* sp.) e 6 (*Desulfovibrio* sp.), conforme classificação apresentada no QUADRO 3.

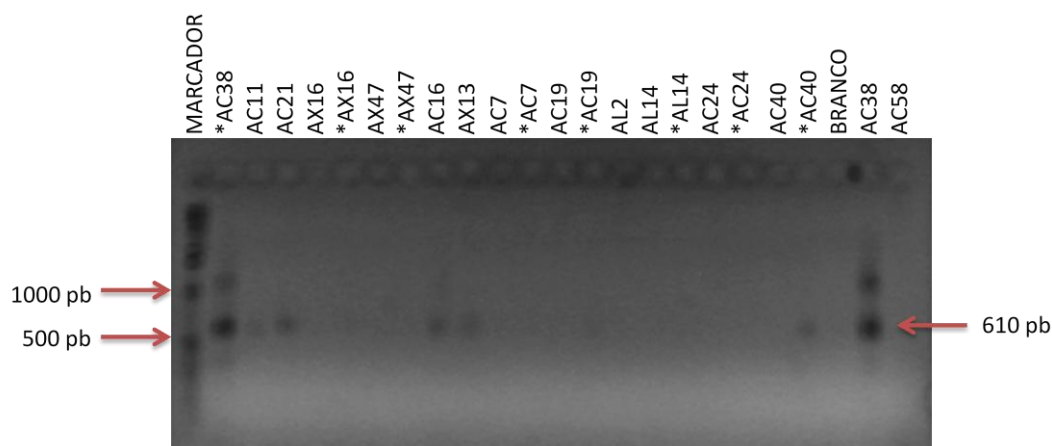


FIGURA 11 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,4% APÓS PCR COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O GRUPO 6 DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Fonte: O autor (2012)

Foram sequenciados os fragmentos de DNA de uma amostra de cada coleta, sendo AC11 da coleta 3, AC19 da 4, AC38 da 5 e AC51 da 6, que apresentaram positividade para o grupo 5 e 6, para confirmação da espécie. Todos os isolados se mostraram pertencentes à espécie *Desulfovibrio putealis*, com 98% de identidade (TABELA 5).

TABELA 5 – IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ISOLADAS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S DO RNA RIBOSSOMAL UTILIZANDO O PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O GRUPO 6

Coleta	Código	Micro-organismo relacionado	Acesso GenBank	Identidade (%)
3	AC11	<i>Desulfovibrio putealis</i>	NR029118.1	98
4	AC19	<i>Desulfovibrio putealis</i>	NR029118.1	98
5	AC38	<i>Desulfovibrio putealis</i>	NR029118.1	98
6	AC51	<i>Desulfovibrio putealis</i>	NR029118.1	98

Fonte: O autor (2012)

Embora não sejam essenciais, as bactérias sulfato-redutoras são as maiores contribuintes para a corrosão influenciada por micro-organismos (RAJASEKAR *et al.*, 2010). Elas crescem no biofilme somente a partir do momento em que o mesmo desenvolve uma região anaeróbia, e passam a reduzir sulfato a sulfeto, que é capaz de potencializar a corrosão química (COETSER; CLOETE, 2005).

5.6 Identificação dos fungos

No total, 94 isolados de fungos foram obtidos, sendo 20 na coleta 1, 23 na coleta 2, 12 na coleta 3, 14 na coleta 4, 11 na coleta 5 e 14 na coleta 6. Através de macro e micromorfologia, foi possível identificá-los a nível de gênero. A maior parte dos isolados são espécies de *Penicillium* sp., mas também há *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Blastomyces* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Lecythophora* sp., *Chrysosporium* sp., *Talaromyces* sp., *Nigrospora* sp. e *Trychophyton* sp. (FIGURA 12 e GRÁFICO 5).

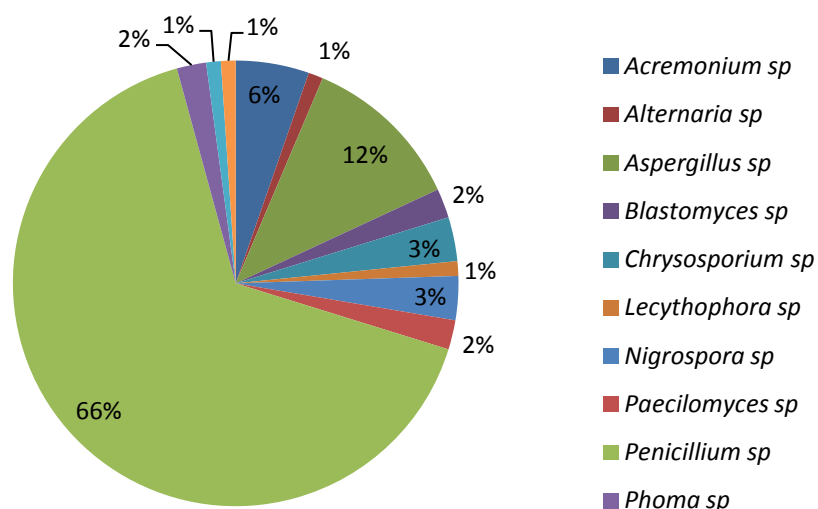


GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ

Fonte: O autor (2012)

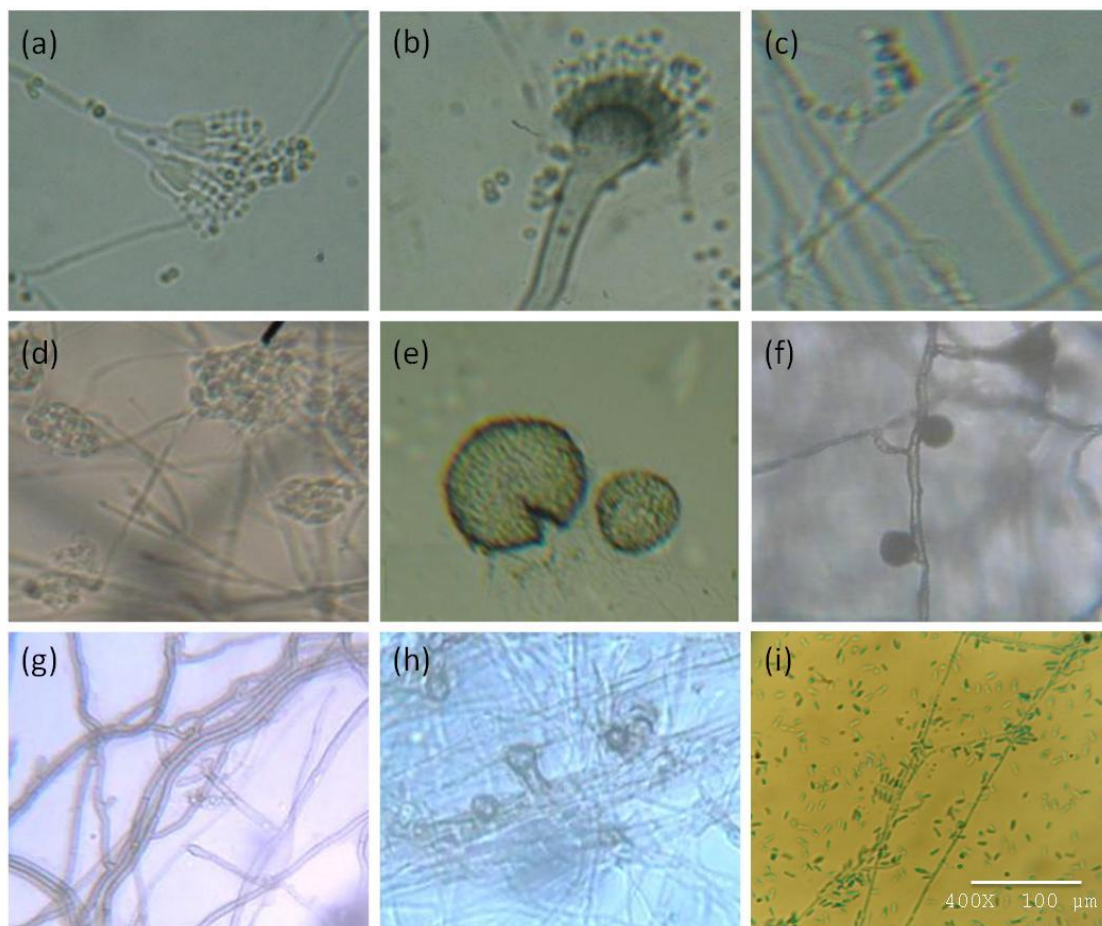


FIGURA 12 – MICROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ISOLADOS OBTIDOS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ. (A) *Penicillium* sp., (B) *Aspergillus* sp., (C) *Paecilomyces* sp., (D) *Acremonium* sp., (E) *Phoma* sp. (F) *Nigrospora* sp., (G) *Trychophyton* sp., (H) *Chrysosporium* sp., (I) *Lecythophora* sp. AUMENTO DE 400X, COM CLAREADOR LACTOFENOL

Fonte: O autor (2012)

Fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* são os mais frequentemente encontrados em biofilmes colonizando sistemas de distribuição de água dos Estados Unidos, Grécia, Alemanha, Noruega, Portugal, Paquistão, Austrália e Brasil, mais especificamente em Recife. Outros gêneros encontrados são *Acremonium*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Phoma*, *Fusarium* e *Trichoderma* (COETSER; CLOETE, 2005; JUZELIÜNAS *et al.*, 2007; KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003; MARANGONI *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2011). Tais dados foram semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

A ação dos fungos na CIM está relacionada a produção de metabólitos, como ácidos e amônia, quelação de cátions metálicos, além de formação de células de concentração (JUZELIÜNAS *et al.*, 2007).

Os fungos foram agrupados de acordo com as características macro e micromorfológicas, e um representante de cada grupo foi identificado por sequenciamento de DNA. Totalizando 36 isolados, a identificação molecular é apresentada na TABELA 6. Não foi possível realizar o sequenciamento de todos os genes para todos os fungos, pois nem todos os genes eram passíveis de serem amplificados devido a dificuldades de padronização, e a repetição exaustiva tem alto custo. Entretanto, foi possível identificar todos os isolados selecionados por meio de, pelo menos, um par de iniciadores.

As espécies identificadas dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* já foram citadas na literatura como parte da microbiota em biofilmes causadores de biocorrosão. Além desses, também já foram isoladas as espécies *Lecythophora* sp., *Westerdykella dispersa*, *Bionectria ochroleuca*, *Paecilomyces lilacinus*, *Sporothrix* sp. e *Microsphaeropsis* sp. em sistemas de água (KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Não foi encontrado na literatura referências sobre a presença dos demais fungos sequenciados em ambientes aquáticos.

TABELA 6 – IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUI POR SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS-1, 5.8S E ITS-2, E DOS GENES DA BETA-TUBULINA, FATOR DE ELONGAÇÃO E RNA POLIMERASE

Coleta	Isolado	Micro-organismo relacionado	Genes sequenciados				Identidade (%)
			ITS	<i>benA</i>	<i>ef-1α</i>	<i>rpb2</i>	
1	AC6 4	<i>Penicillium citrinum</i> (JQ316514.1)	KJ413361	KJ413328	KJ476395	KJ476421	100
1	AC13 1	<i>Lecythophora</i> sp. (KC007155.1)	KJ413373	KJ413345	KJ476409	KJ476436	99
1	AC13 3	<i>Penicillium citrinum</i> (JQ316514.1)	KJ413362	KJ413329	KJ476396	KJ476422	100
1	AC13 7	<i>Penicillium shearii</i> (JN606850.1)	-	KJ413338	KJ476402	-	99
1	AX21 1*	<i>Penicillium verruculosum</i> (JN565299.1)	KJ413368	KJ413340	KJ476404	KJ476428	100
1	AX21 2	<i>Aspergillus fumigatus</i> (JX545087.1)	-	KJ413347	KJ476410	-	100
1	AX46 2	<i>Penicillium citrinum</i> (JQ316514.1)	KJ413363	KJ413330	KJ476397	KJ476423	100
2	AC15 4	<i>Westerdykella dispersa</i> (AY943055.1)	KJ413374	KJ413346	-	-	99
2	AC15 5	<i>Penicillium shearii</i> (JN606850.1)	-	KJ413339	KJ476403	KJ476429	100
2	AC15 8	<i>Aspergillus terreus</i> (FJ491709.1)	-	KJ413348	-	-	99
2	AC45 3	<i>Penicillium chrysogenum</i> (EU128560.1)	KJ413370	KJ413341	KJ476405	KJ476430	100
2	AC45 6	<i>Penicillium citrinum</i> (JQ717340.1)	KJ413364	KJ413331	-	KJ476424	100
2	AC48 1	<i>Aspergillus tennesseensis</i> (JQ301895.1)	KJ413375	KJ413349	KJ476411	KJ476437	100
2	AC48 4*	<i>Bionectria ochroleuca</i> (JQ411384.1)	KJ413378	KJ413352	-	-	99
2	AC48 7	<i>Aspergillus sydowii</i> (JN853936.1)	KJ413376	KJ413350	KJ476412	KJ476438	100

2	AC48 16	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (GU979977.1)	-	-	KJ476413	-	99
2	AX44 1	<i>Penicillium citrinum</i> (KC345003.1)	-	KJ413332	-	-	100
3	AC11 1	<i>Penicillium citrinum</i> (GU944561.1)	KJ413365	KJ413333	KJ476398	KJ476425	100
3	AC11 2	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (EU715613.1)	KJ413379	-	KJ476414	KJ476439	97
3	AC16 2	<i>Aspergillus versicolor</i> (EU888928.1)	KJ413377	KJ413351	-	-	100
3	AC21 4	<i>Sporothrix inflata</i> (AY495444.1)	-	KJ413353	KJ476416	-	97
4	AC7 2	<i>Auxarthron chlamydosporum</i> (AJ426458.1)	KJ413382	KJ413354	KJ476417	-	96
4	AC19 1	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (EU715613.1)	KJ413380	KJ413355	KJ476415	KJ476440	98
4	AC24 2	<i>Talaromyces stipitatus</i> (JX122729.1)	KJ413383	KJ413358	KJ476419	-	100
4	AC24 3*	<i>Penicillium aculeatum</i> (HM061307.1)	KJ413369	KJ413343	KJ476407	KJ476432	99
4	AC24 5	<i>Penicillium citrinum</i> (GU944561.1)	KJ413366	KJ413334	KJ476399	KJ476426	100
4	AL2 1	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (EU715613.1)	KJ413381	KJ413356	-	-	97
4	AL2 2	<i>Penicillium chrysogenum</i> (HQ026745.1)	KJ413371	KJ413342	KJ476406	KJ476431	99
4	AL2 3	<i>Penicillium citrinum</i> (KC345003.1)	-	KJ413335	-	-	100
5	AC38 1	<i>Penicillium citrinum</i> (KC345003.1)	-	KJ413336	KJ476400	-	99
5	AC38 3	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (EF094556.1)	KJ413387	KJ413357	KJ476418	-	100
5	AC40 1	<i>Penicillium citrinum</i> (EU645682.1)	KJ413367	KJ413337	KJ476401	KJ476427	100
6	AC58 2	<i>Talaromyces amestolkiae</i> (JX965214.1)	KJ413384	KJ413359	KJ476420	KJ476434	100

6	AC58 5*	<i>Penicillium pinophilum</i> (FJ619262.1)	KJ413372	KJ413344	KJ476408	KJ476433	98
6	AC58 6	<i>Talaromyces amestolkiae</i> (JX965214.1)	KJ413385	KJ413360	-	KJ476435	100
6	AC62 2	<i>Talaromyces amestolkiae</i> (JX965214.1)	KJ413386	-	-	-	100

Fonte: O autor (2013)

Nota: Todas as sequências foram depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os códigos apresentados são referentes aos números de acesso. Os isolados marcados com (*) foram inicialmente identificados como *Penicillium verruculosum*, *Penicillium aculeatum*, *Penicillium pinophilum* e *Bionectria ochroleuca*. Porém, após a submissão das sequências suas identificações foram alteradas para *Talaromyces verruculosus*, *Talaromyces aculeatus*, *Talaromyces pinophilus* e *Clonostachys rosea*, respectivamente. Os fungos do gênero *Penicillium* e *Clonostachys* são anamórficos, ou seja, se reproduzem apenas assexuadamente, enquanto *Talaromyces* e *Bionectria* são teleomórficos, e se reproduzem sexuadamente ou assexuadamente. Anamórficos e teleomórficos representam diferentes estados reprodutivos do mesmo micro-organismo, que pode, portanto, ser identificado com qualquer um dos dois nomes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

5.7 Comparação de identificação morfológica e molecular

Por serem espécies pouco conhecidas e haver discordância entre as identificações morfológica e molecular, foram selecionados os isolados AC15 4 e AC48 4 da coleta II, AC11 2 e AC21 4 da coleta III, AC7 2 da coleta IV e AC38 3 da coleta V para visualização em MEV e análise filogenética. Em todos os casos, a identificação molecular foi confirmada segundo literatura especializada.

O isolado AC15 4 (FIGURA 13) foi identificado por microcultivo como *Phoma* sp., e molecularmente como *Westerdykella dispersa*. De acordo com Clum (1955), que primeiro caracterizou a espécie, o micélio é homotático e ramificado, com hifas de 1 a 6 μm de diâmetro. O asco é globoso, com diâmetro de 10-14,5 μm , e os ascósporos de 2 a 6 μm . Já os fungos pertencentes ao gênero *Phoma* apresentam picnídio esférico ostiolado de 60-400 μm , dependendo da espécie, e as estruturas reprodutivas possuem formato elipsoide, diferente da amostra em questão (DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001).

A análise filogenética da região ITS confirmou que o isolado AC15 4 agrupa-se com os isolados dos gêneros *Westerdykella* e *Pycnidiophora* (FIGURA 14). A árvore foi gerada com máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

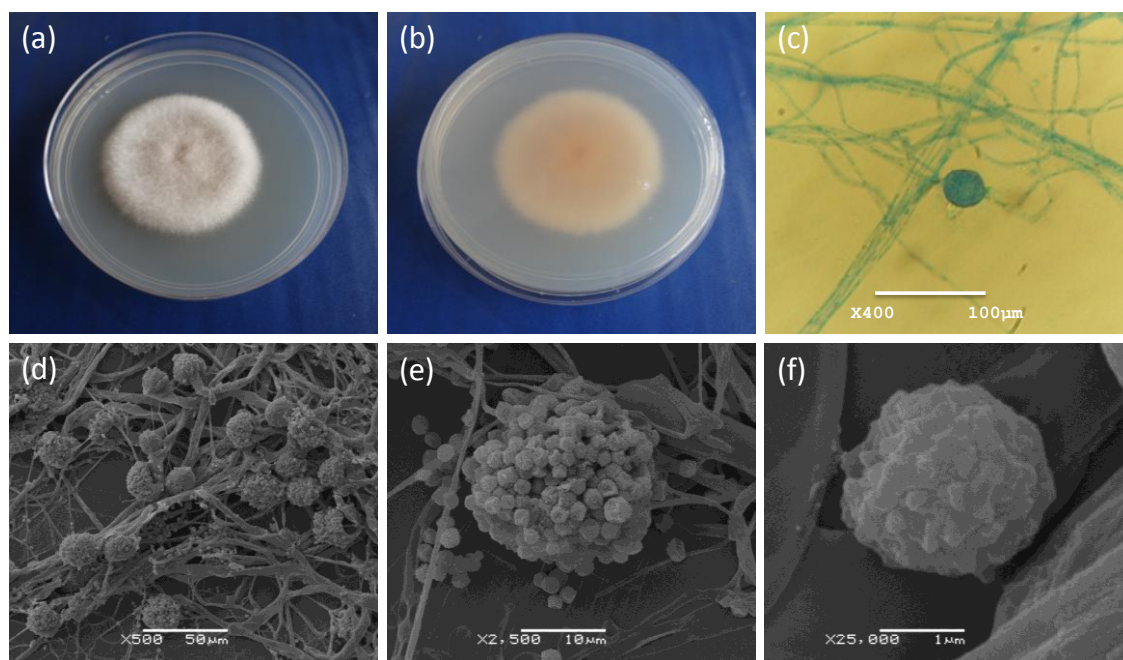


FIGURA 13 – ISOLADO AC15 4, IDENTIFICADO COMO *Westerdykella dispersa*. (A) E (B) VERSO E REVERSO DA PLACA DE MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO POR 4 DIAS A 28°C; (C) MICROCULTIVO COM CLAREADOR LACTOFENOL COM AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 400X; (D) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AUMENTO DE 500X; (E) MEV DO ASCO EM AUMENTO DE 2500X; (F) MEV DO ESPORO EM AUMENTO DE 25000X
Fonte: O autor (2013)

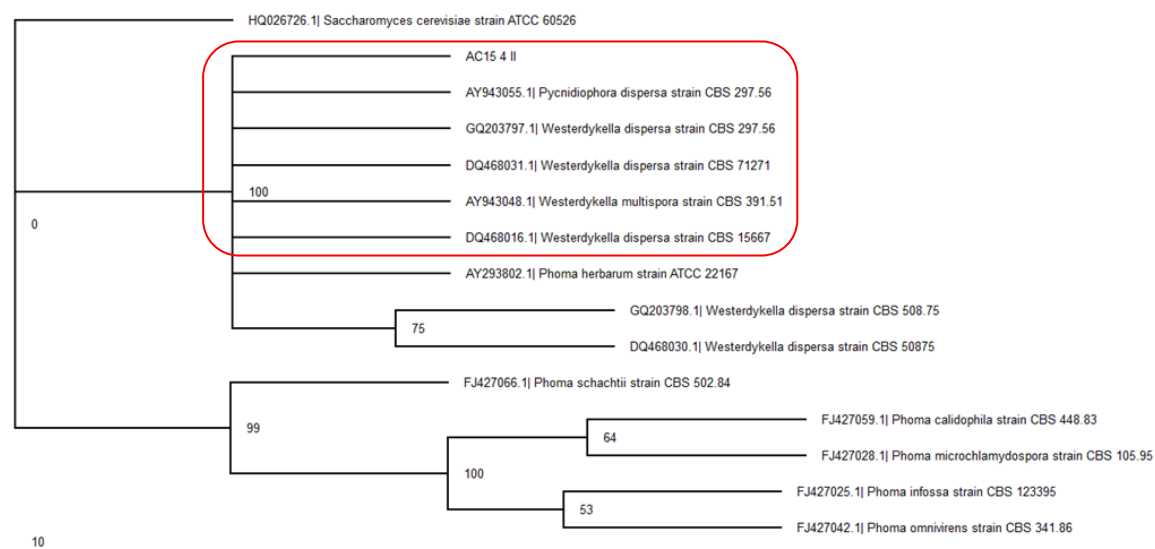


FIGURA 14 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Westerdykella*, *Pycnidophora* E *Phoma* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Nota: A linhagem referência de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como grupo externo. O número de bootstraps foi 1000 repetições, e o número de cada ramo indica a frequência que o agrupamento apareceu ao longo das repetições. O círculo vermelho indica o agrupamento ao qual pertence o isolado AC15 4 II.

FONTE: O autor (2014)

Espécies de *Westerdykella* e *Pycnidiophora* já foram encontradas em amostras ambientais, como em sistemas de água (KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003), água do mar (PANNO *et al.*, 2013) e atuando como endofíticos em plantas consideradas saudáveis (ANGELINI *et al.*, 2012).

O isolado AC48 4 (FIGURA 15) foi identificado por microcultivo como *Acremonium* sp., e molecularmente como *Bionectria ochroleuca*. Tanto na microscopia óptica quanto na eletrônica foi visualizada a estrutura assexuada do fungo, que possui como característica fiálides não ramificadas (SCHROERS; SAMUELS, 1997). Algumas características do gênero *Acremonium*, como fiálides e conidióforos simples, foram verificadas no aumento de 400X. Entretanto, os conídios deste gênero são menores, com tamanhos variando entre 3 a 6 μm de comprimento e 1 a 2,5 μm de espessura (DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001).

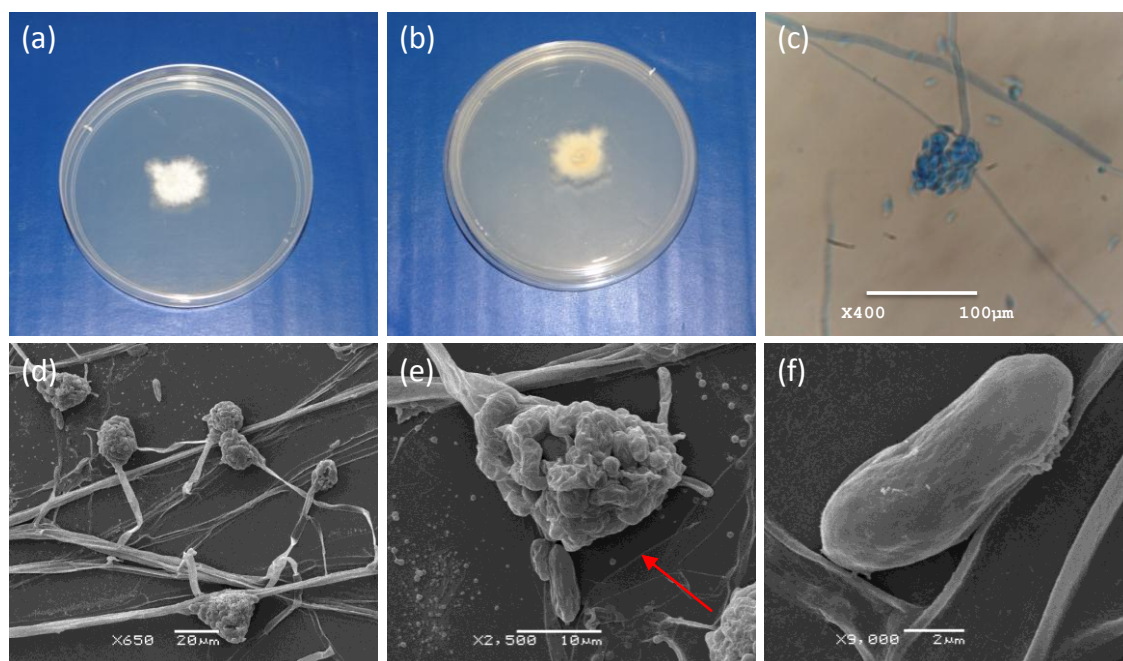


FIGURA 15 – ISOLADO AC48 4, IDENTIFICADO COMO *Bionectria ochroleuca*. (A) E (B) VERSO E REVERSO DA PLACA DE MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO POR 4 DIAS A 28°C; (C) MICROCULTIVO COM CLAREADOR LACTOFENOL COM AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 400X; (D) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AUMENTO DE 650X; (E) MEV DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 2500X; (F) MEV DO CONÍDIO EM AUMENTO DE 9000X

Nota: A seta vermelha indica a fiálide sem ramificação, característica presente na espécie *Bionectria ochroleuca*.

Fonte: O autor (2013)

A análise filogenética da região ITS também confirmou a identidade do isolado AC48 4 após agrupamento com demais linhagens de *Bionectria ochroleuca* (FIGURA 16). A árvore foi gerada com máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

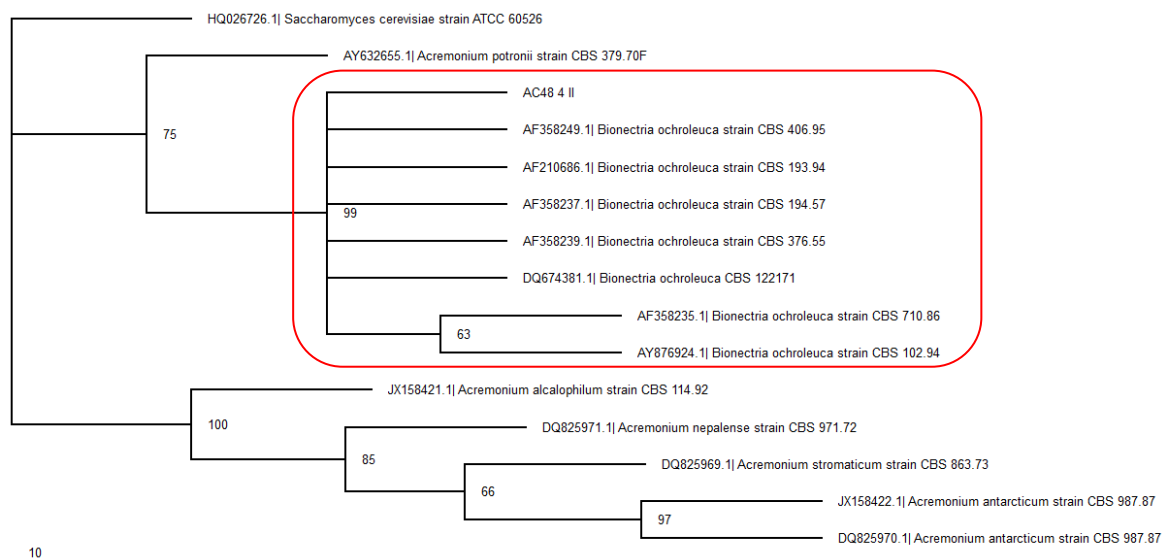


FIGURA 16 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Bionectria* E *Acremonium* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Nota: A linhagem referência de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como grupo externo. O número de bootstraps foi 1000 repetições, e o número de cada ramo indica a frequência que o agrupamento apareceu ao longo das repetições. O círculo vermelho indica o agrupamento ao qual pertence o isolado AC48 4 II.

FONTE: O autor (2014)

Espécies de *Bionectria* são encontradas em diversos nichos ecológicos. Podem ser decompositoras, necrotróficas, biotróficas, e algumas espécies são parasitas de plantas e animais. Economicamente, também são utilizadas no controle biológico (SCHROERS; SAMUELS, 1997).

O isolado AC11 2 (FIGURA 17) foi identificado por microcultivo como *Nigrospora* sp., e *Hypoxylon fragiforme* por biologia molecular. Segundo Kickx (1835), os fungos da espécie *H. fragiforme* apresentam conídios ovóides de 3 a 6 µm que crescem a partir do ápice do conidióforo. Após a liberação do conídio, cicatrizes podem permanecer no conidióforo, que são geralmente longos e mais afunilados no ápice. A colônia pode apresentar micélio aéreo de cor branca acinzentada, sendo as regiões esporulantes de coloração marrom clara ou amarelada. Apesar de o gênero *Nigrospora* apresentar as mesmas

características em cultura, na visualização em microscópio verificam-se conídios únicos partindo do ápice e das laterais das hifas, além de apresentar um sulco na lateral (DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001).

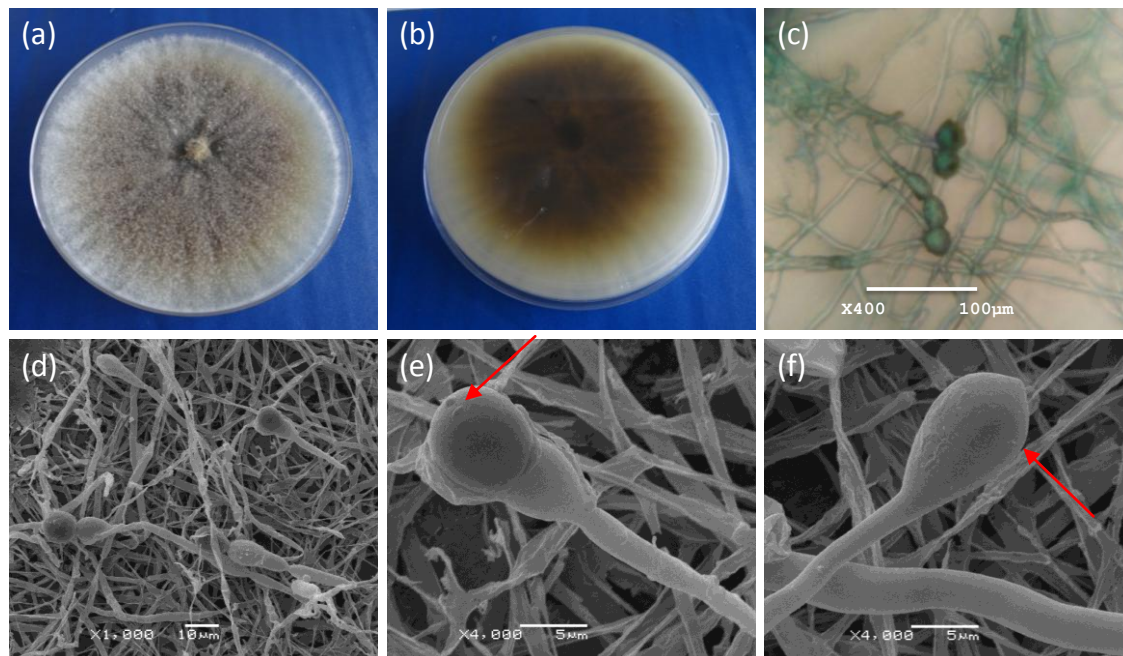


FIGURA 17 – ISOLADO AC11 2, IDENTIFICADO COMO *Hypoxylon fragiforme*. (A) E (B) VERSO E REVERSO DA PLACA DE MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO POR 4 DIAS A 28°C; (C) MICROCULTIVO COM CLAREADOR LACTOFENOL COM AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 400X; (D) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AUMENTO DE 1000X; (E) E (F) MEV DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 4000X

Nota: As setas vermelhas indicam a cicatriz presente no conidióforo e o afunilamento do ápice do mesmo.

Fonte: O autor (2013)

O isolado AC11 2 foi confirmado como *Hypoxylon fragiforme* após análise filogenética da região ITS (FIGURA 18). A árvore foi gerada com máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

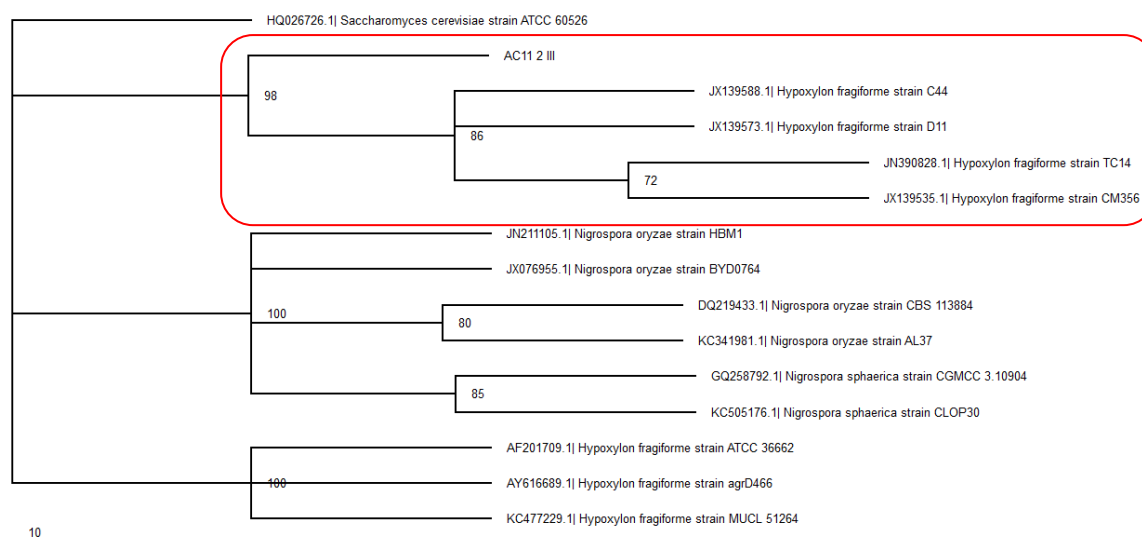


FIGURA 18 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Hypoxylon* E *Nigrospora* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Nota: A linhagem referência de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como grupo externo. O número de bootstraps foi 1000 repetições, e o número de cada ramo indica a frequência que o agrupamento apareceu ao longo das repetições. O círculo vermelho indica o agrupamento ao qual pertence o isolado AC11 2 III.

FONTE: O autor (2014)

Hypoxylon fragiforme, bem como outros fungos da família Xylariaceae, são comumente encontrados na natureza, crescendo em troncos de árvores e em arbustos. Podem causar doenças na madeira e nas folhas (CHAPELA; PETRINI; BIELSER, 1993), mas também é economicamente importante graças à produção de metabólitos secundários, como pigmentos e nematicidas (STADLER *et al.*, 2006).

O isolado AC21 4 (FIGURA 19) foi identificado por microcultivo como *Acremonium* sp., e molecularmente como *Sporothrix inflata*. Tal fungo tem como característica colônias brancas, mas escurecidas, e seus conidióforos crescem a partir de hifas indiferenciadas. Os conídios, de 2,5 a 5,5 µm de comprimento, estão agrupados e apresentam crescimento simpodial, ou seja, crescem lateralmente ao longo da hifa (DE HOOG, 1974). Já o gênero *Acremonium* apresenta fiálides simples, crescendo eretas a partir de hifas indiferenciadas. Os conídios estão em agregados de 2 a 6 µm de diâmetro (DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001), e não crescendo lateralmente como na FIGURA 19.

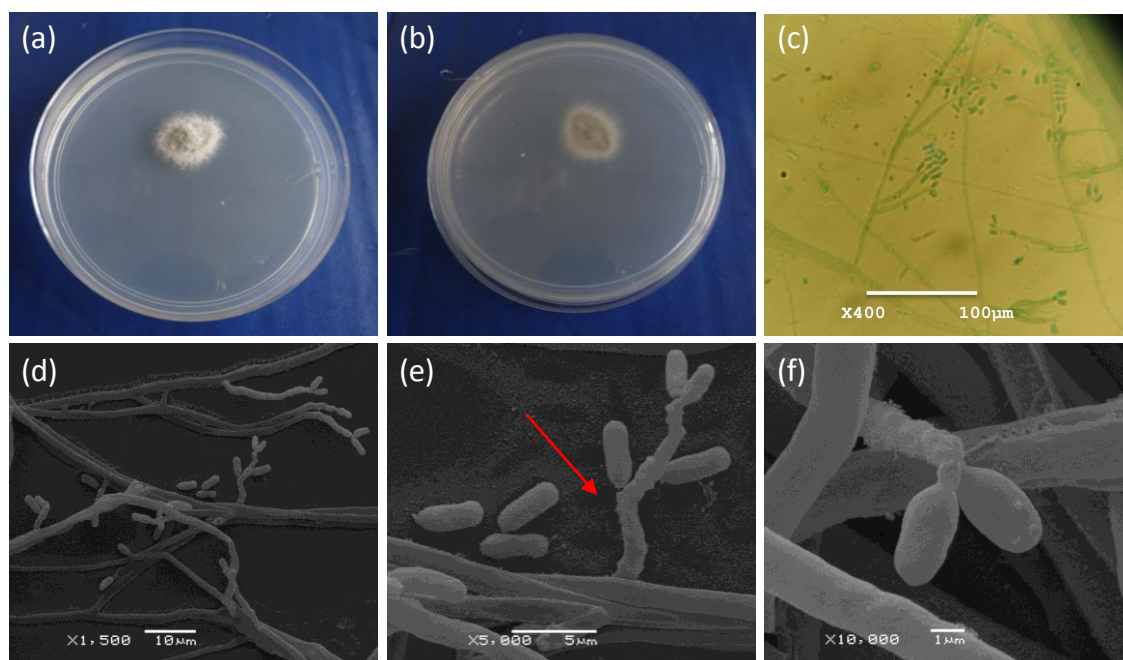


FIGURA 19 – ISOLADO AC21 4, IDENTIFICADO COMO *Sporothrix inflata*. (A) E (B) VERSO E REVERSO DA PLACA DE MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO POR 4 DIAS A 28°C; (C) MICROCULTIVO COM CLAREADOR LACTOFENOL COM AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 400X; (D) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AUMENTO DE 1500X; (E) MEV DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 5000X; (F) MEV DO CONÍDIO EM AUMENTO DE 10000X

Nota: A seta vermelha indica o crescimento simpodial dos conídeos.

Fonte: O autor (2013)

A análise filogenética do gene parcial da beta-tubulina também confirmou a identidade do isolado AC21 4 como *Sporothrix inflata* (FIGURA 20). A árvore foi gerada com máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

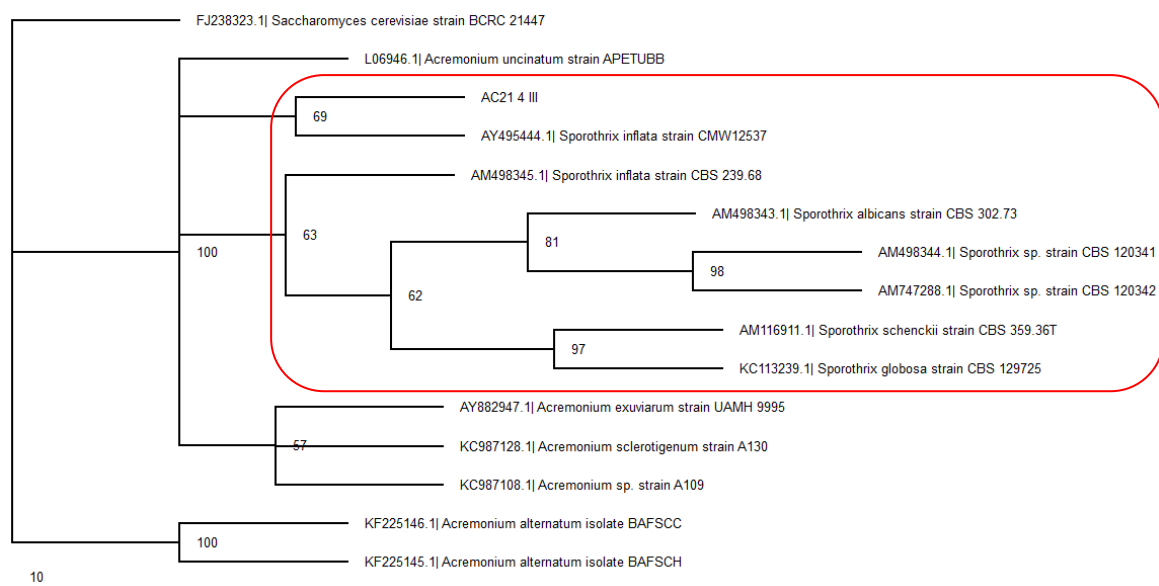


FIGURA 20 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Sporothrix* E *Acremonium* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DO GENE PARCIAL DA BETA-TUBULINA E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Nota: A linhagem referência de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como grupo externo. O número de bootstraps foi 1000 repetições, e o número de cada ramo indica a frequência que o agrupamento apareceu ao longo das repetições. O círculo vermelho indica o agrupamento ao qual pertence o isolado AC21 4 III.

FONTE: O autor (2014)

Sporothrix sp. é encontrado no ambiente, e quando em contato com feridas, pode causar a esporotricose. A doença é uma micose subcutânea que atinge o homem, mas também pode afetar outros animais, como cães e gatos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O isolado AC7 2 (FIGURA 21) foi identificado morfológicamente como *Chrysosporium* sp., e molecularmente como *Auxarthron chlamydosporum*. Segundo Solé *et al.* (2002), as colônias de *Auxarthron chlamydosporum* são flocosas e brancas, escurecendo quando maduras. As hifas têm apêndices tuberculados e os ascósporos são esféricos de diferentes tamanhos. A diferença para o gênero *Chrysosporium* está nos esporos, que são ovalados, com 6 a 11 µm de altura por 3 a 4,5 µm de espessura (DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001).

A análise filogenética da região ITS confirmou que o isolado AC7 2 agrupa-se com os isolados do gênero *Auxarthron* (FIGURA 22). A árvore foi gerada com máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

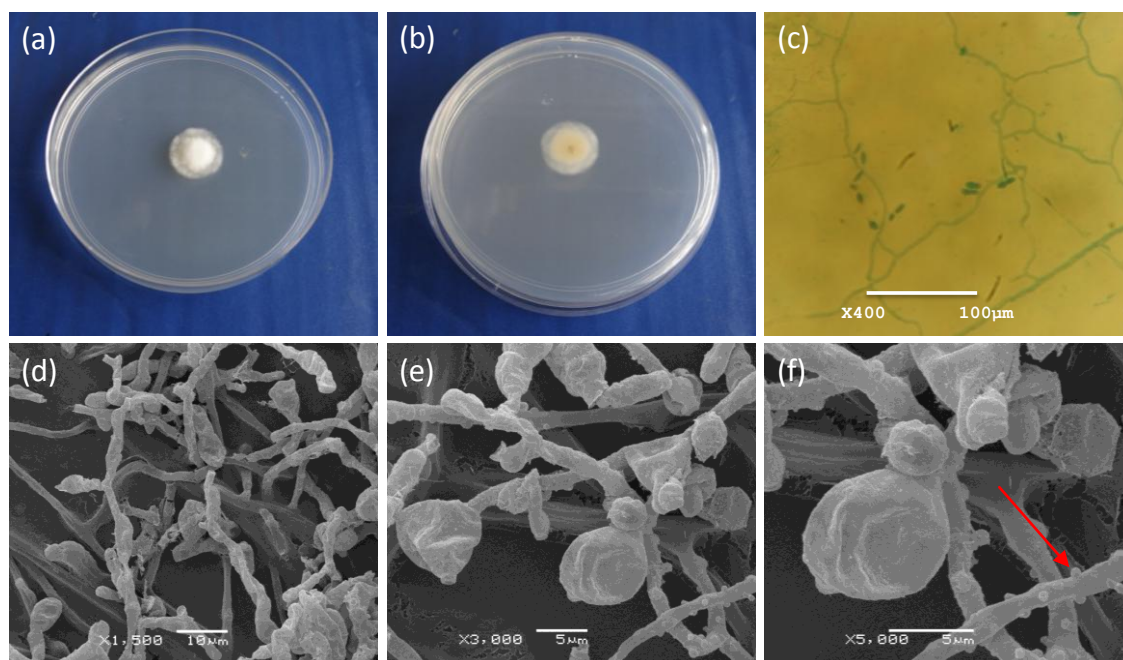


FIGURA 21 – ISOLADO AC7 2, IDENTIFICADO COMO *Auxarthron chlamydosporum*. (A) E (B) VERSO E REVERSO DA PLACA DE MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO POR 4 DIAS A 28°C; (C) MICROCULTIVO COM CLAREADOR LACTOFENOL COM AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 400X; (D) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM AUMENTO DE 1500X; (E) MEV DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 3000X; (F) MEV DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 5000X

Nota: A seta vermelha indica os apêndices presentes nas hifas.

Fonte: O autor (2013)

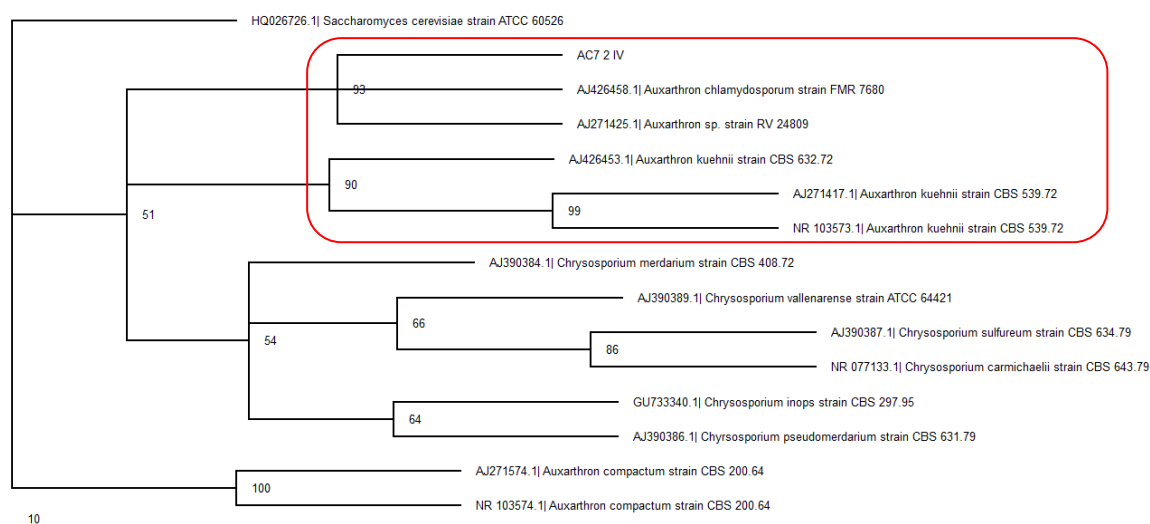


FIGURA 22 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Auxarthron* E *Chrysosporium* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Nota: A linhagem referência de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como grupo externo. O número de bootstraps foi 1000 repetições, e o número de cada ramo indica a frequência que o agrupamento apareceu ao longo das repetições. O círculo vermelho indica o agrupamento ao qual pertence o isolado AC7 2 IV.

FONTE: O autor (2014)

Poucas informações estão disponíveis para a espécie *Auxarthron chlamydosporum*. Entretanto, a ordem Onygenales, que inclui tal espécie, é conhecida por apresentar a capacidade de crescer em substratos queratinizados e, portanto, atuarem como decompositores (BLYSKAL, 2009).

O isolado AC38 3 (FIGURA 23) foi identificado morfológicamente como *Chrysosporium* sp., e molecularmente como *Microsphaeropsis arundinis*. Sutton (1980) afirma que o gênero *Microsphaeropsis* possui picnídio globuloso, de cerca de 100 μm de diâmetro. O conidióforo é cilíndrico, de diâmetro variando de 4,5 a 10 μm . As colônias, quando crescidas em meio BDA, apresentam cor cinza claro. Novamente, o gênero *Chrysosporium* foi descartado por não apresentar esporos redondos (DE HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2001).

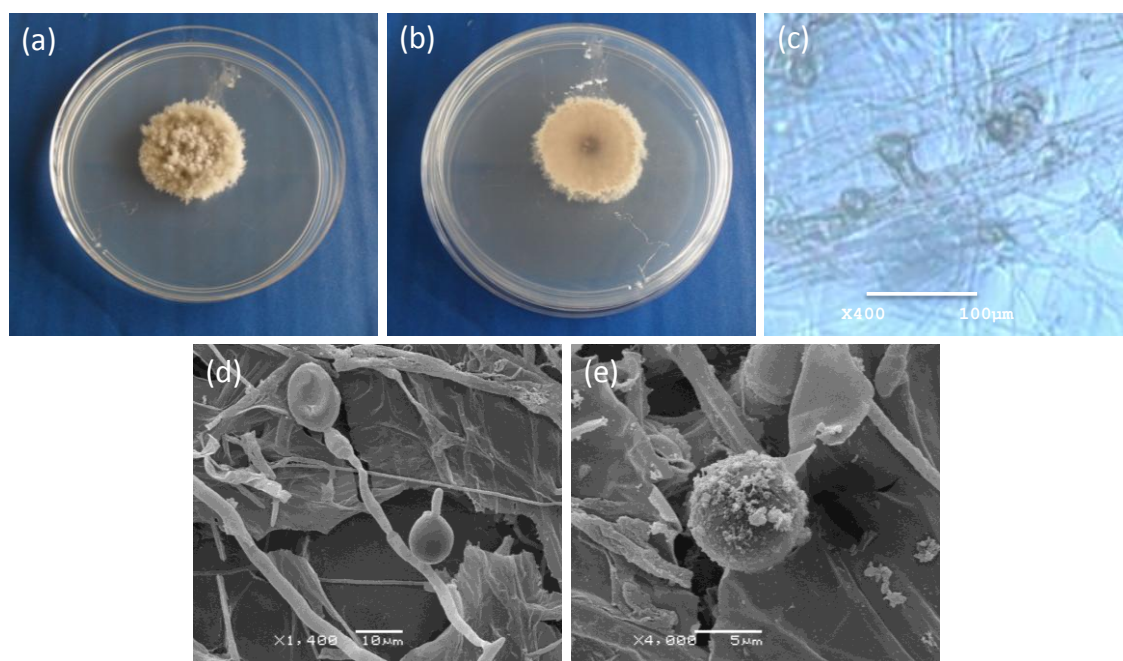


FIGURA 23 – ISOLADO AC38 3, IDENTIFICADO COMO *Microsphaeropsis arundinis*. (A) E (B) VERSO E REVERSO DA PLACA DE MEIO BDA APÓS INCUBAÇÃO POR 4 DIAS A 28°C; (C) MICROCULTIVO COM CLAREADOR LACTOFENOL COM AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 400X; (D) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 1400X; (E) MEV DO CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 4000X.

Fonte: O autor (2013)

O isolado AC38 3 foi confirmado como *Microsphaeropsis arundinis* após análise filogenética da região ITS (FIGURA 24). A árvore foi gerada com

máxima verossimilhança utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros.

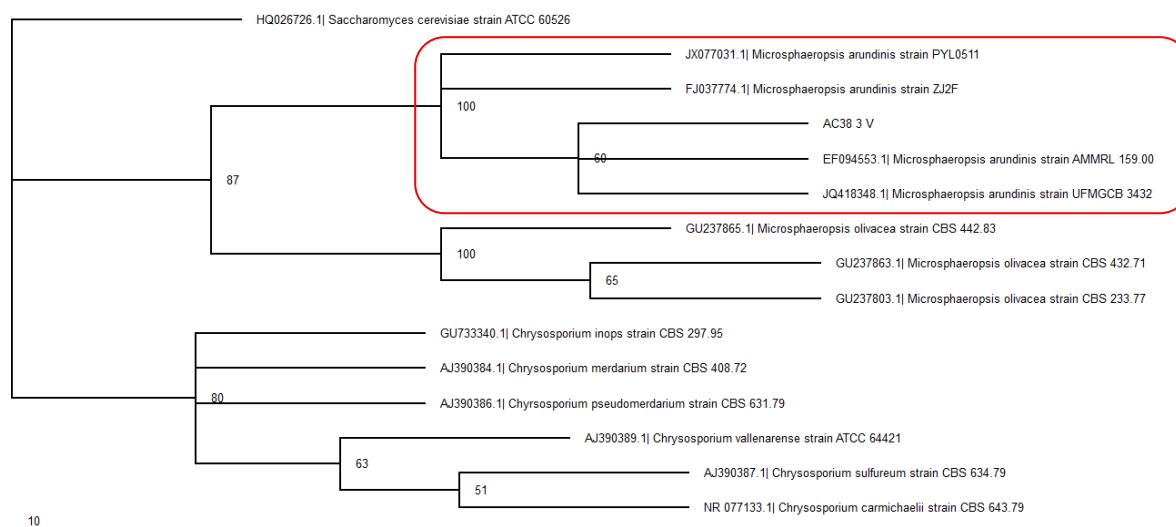


FIGURA 24 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Microsphaeropsis* E *Chrysosporium* BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS E CONSTRUÍDA COM MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Nota: A linhagem referência de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como grupo externo. O número de bootstraps foi 1000 repetições, e o número de cada ramo indica a frequência que o agrupamento apareceu ao longo das repetições. O círculo vermelho indica o agrupamento ao qual pertence o isolado AC38 3 V.

FONTE: O autor (2014)

M. arundinis está naturalmente presente na água (KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003), e também foi encontrado como endofítico (SOMMART *et al.*, 2012). É causador de infecções de pele em mamíferos, sendo que nos humanos apenas em casos de pacientes imunocomprometidos (HALL; KEELING; BRUMBLE, 2009). Também é bastante estudado por produzir compostos bioativos, de atividade antifúngica, antimalária e antioxidante (SOMMART *et al.*, 2012).

5.8 Padronização da técnica de espectroscopia no infravermelho

5.8.1 Bactérias

Entre os solventes utilizados, somente a água e a solução de NaCl 0,85% permitiram produzir uma suspensão homogênea, inclusive sem haver a

necessidade de agitação vigorosa. Os demais solventes revelaram, mesmo após terem passado pelo ultrassom, uma quantidade de células muito agrupadas. Solventes como o óleo mineral e a glicerina revelaram-se como impróprios para as análises realizadas, pois a viscosidade dessas substâncias dificulta tanto a suspensão das células quanto à aplicação da amostra no equipamento. O éter de petróleo também não é de fácil utilização, já que há uma taxa de evaporação dessa substância muito elevada desde o preparo da amostra. A acetonitrila, o clorofórmio, o ciclohexano e o acetato de etila tiveram resultados aceitáveis, pois o espectro obtido para cada solvente não interfere em faixas importantes às análises de amostras biológicas.

Entretanto, ao analisar os espectros das substâncias testadas, a água foi descartada como um possível solvente a ser utilizado, pois como já afirmado por Barth e Harris (2009), sua absorbância é excessiva para o infravermelho médio, sobrepondo-se às bandas de absorção geradas pela bactéria e impossibilitando seu uso. Já dentre acetonitrila, clorofórmio, ciclohexano e acetato de etila, o clorofórmio (FIGURA 25) apresentou o espectro que possibilita a melhor visualização do maior número de bandas, em relação aos outros solventes, com poucos picos de absorbância superiores a 1,0 nos comprimentos de onda de importância biológica (QUADRO 2).

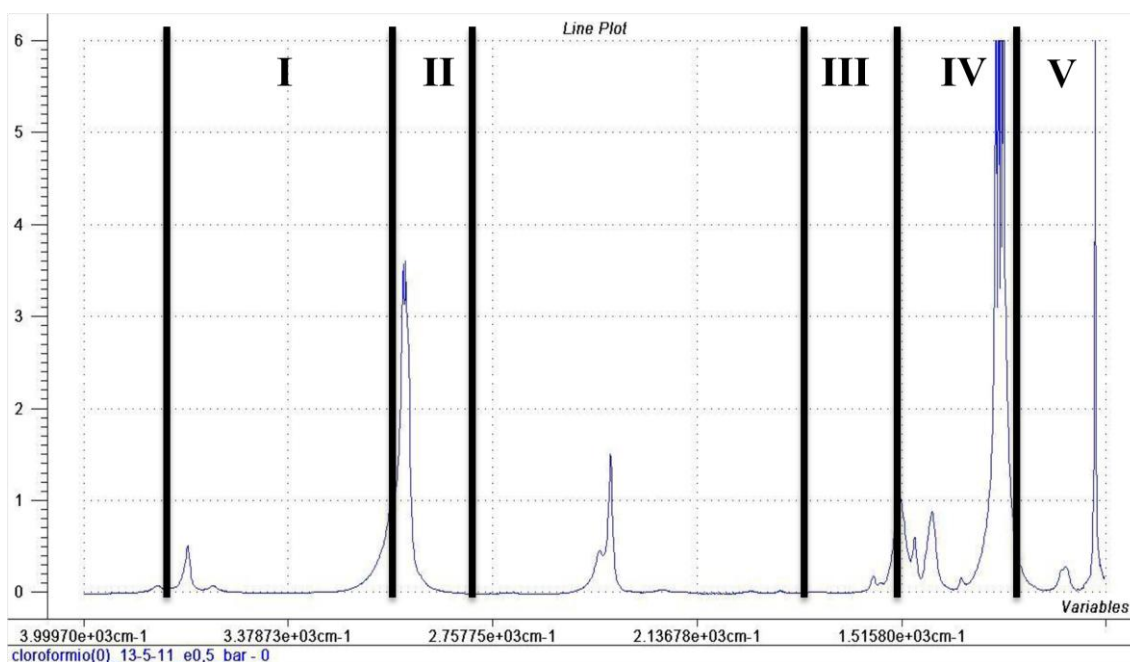
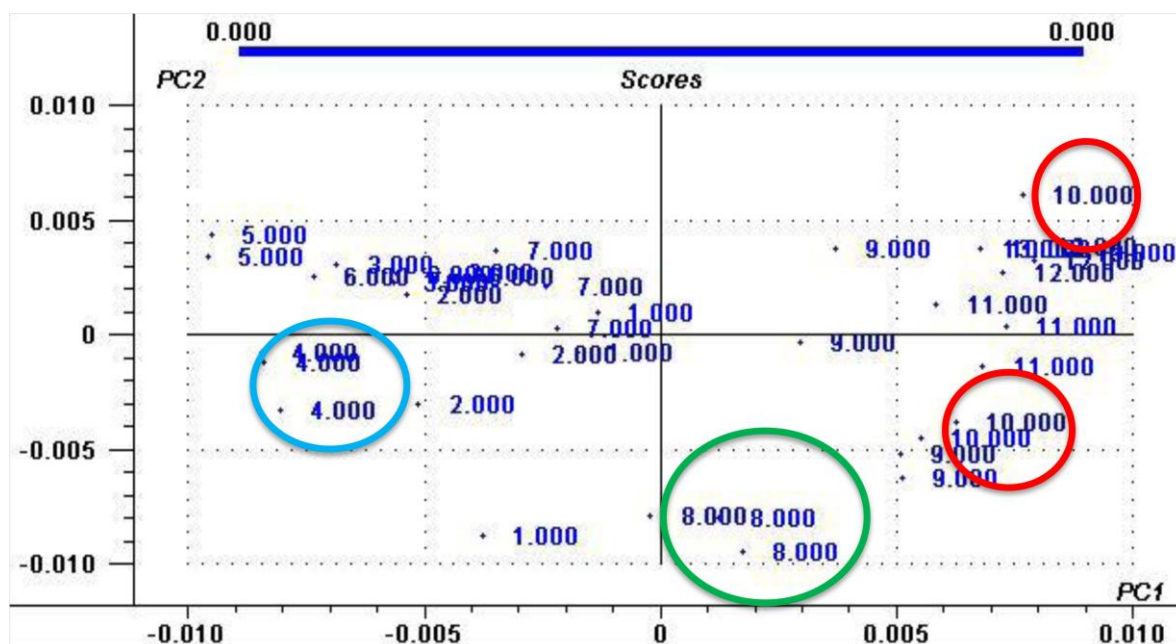


FIGURA 25 – ESPECTRO DO CLOROFÓRMIO REGISTRADO ATRAVÉS DE FT-IR. REGIÕES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA: (I) PROTEÍNAS E LIPÍDEOS, (II) LIPÍDEOS, (III) PROTEÍNAS, (IV) PROTEÍNAS E LIPÍDEOS, (V) POLISSACARÍDEOS
Fonte: O autor (2013)

Em relação à análise quimiométrica, vários pré-tratamentos foram testados, mas houve dificuldade de se encontrar uma técnica que permitisse um agrupamento correto das amostras, o que possibilitaria a identificação dos micro-organismos analisados. Com a sequência de tratamentos, foi aplicada a regressão PLS1, com validação cruzada e 5 componentes principais, atribuindo valores qualitativos para cada linhagem (FIGURA 26).

Foi possível fazer a separação de algumas amostras, contudo, agrupamentos incoerentes impediram a formação de um banco de dados que permitisse a identificação correta de micro-organismos. Tal dificuldade pode ter sido ocasionada pela homogeneização insuficiente das amostras.



RESULT1, X-expl: 32%,49% Y-expl: 71%,2%

FIGURA 26 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BACTÉRIAS QUANTO À ESPÉCIE POR TRANSMITÂNCIA

Legenda: *Escherichia coli* (azul), *Pseudomonas aeruginosa* (verde), e *Staphylococcus aureus* (vermelho).

Fonte: O autor (2013)

Para corrigir essa dificuldade, uma alternativa é a secagem da amostra diretamente sobre o cristal de ZnSe (NAUMANN, 2000). Desta maneira é eliminada a influência do solvente sobre o espectro resultante, e a água pode ser utilizada para correta homogeneização das células.

Como o feixe de infravermelho passa pela célula íntegra, a separação das bactérias é feita considerando as diferenças químicas das estruturas fora da membrana plasmática, como a parede celular, membrana externa ou cápsulas. Por exemplo, as lipopolissacarídeos estão presentes na parede celular das bactérias Gram-negativas, e os polissacarídeos de carga negativa presentes nas cápsulas de alguns bacilos (NAUMANN, 2000).

5.8.2 Fungos

A padronização foi feita utilizando 8 amostras pertencentes ao gênero *Aspergillus*, sendo *A. carbonarius* (1 e 7), *A. niger* (2, 8 e 9), *A. westerdijkiae* (3), *A. ochraceus* (4) e *A. parasiticus* (10).

Após preparo das amostras pelas três metodologias testadas, verificou-se que a utilização direta dos esporos e micélio aéreo foi a melhor técnica. Após liofilização ou secagem em estufa, o micélio ainda apresentava pequena porcentagem de água, diminuindo a qualidade do espectro resultante (BARTH; HARRIS, 2009). Além disso, as demais metodologias exigem muitas etapas de preparo, o que pode interferir na reprodutibilidade do experimento (MAQUELIN *et al.*, 2002).

Entre as técnicas de espectroscopia no infravermelho analisadas, a transmitância foi a que melhor possibilitou a separação das amostras após tratamento estatístico. O espectro obtido por reflectância difusa não mostrou sinal significativo, além de apresentar muito ruído (FIGURA 27), enquanto na análise por ATR não foi possível separar amostras com características químicas semelhantes (FIGURA 28). Portanto, as duas técnicas de reflectância foram descartadas para análises posteriores.

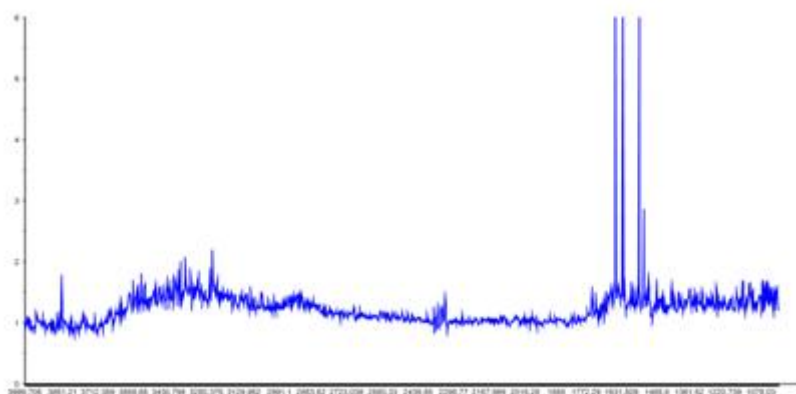


FIGURA 27. ESPECTRO DE ASPERGILLUS PARASITICUS ANALISADO POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRIFT)

Fonte: O autor (2013)

O tempo de cultivo não interferiu nas análises, portanto optou-se por 4 dias de incubação para obtenção dos esporos e micélio aéreo.

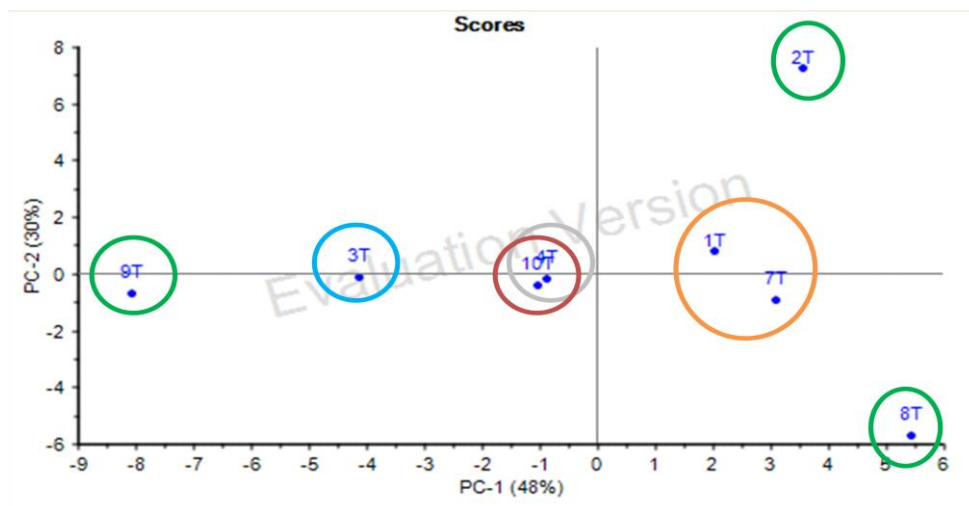


FIGURA 28 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS POR ATR

Legenda: *Aspergillus carbonarius* (1 e 7), *A. niger* (2, 8 e 9), *A. westerdijkiae* (3), *A. ochraceus* (4) e *A. parasiticus* (10).

Fonte: O autor (2013)

Com a transmitância, os fungos foram separados de acordo com sua espécie sem a necessidade de pré-tratamentos, utilizando somente regressão por PLS1 (FIGURA 29).

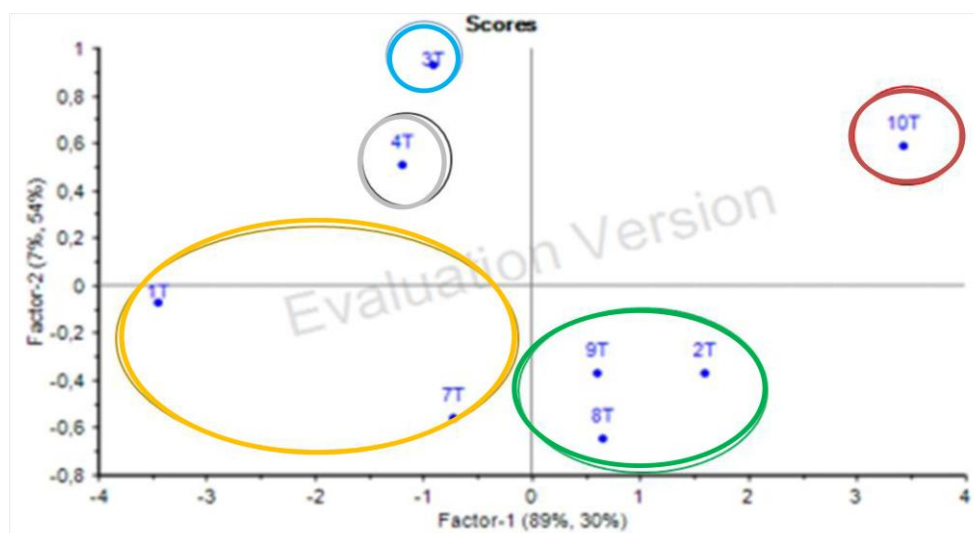


FIGURA 29 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS POR TRANSMITÂNCIA

Legenda: *Aspergillus carbonarius* (1 e 7), *A. niger* (2, 8 e 9), *A. westerdijkiae* (3), *A. ochraceus* (4) e *A. parasiticus* (10).

Fonte: O autor (2013)

Sendo assim, a padronização utilizando micélio e esporos raspados a partir do meio sólido, depois triturados com brometo de potássio (1:20) e então

prensados para obtenção da pastilha foi a metodologia utilizada para as análises seguintes. Os espectros foram coletados através da técnica de transmitância.

5.9 Construção de banco de dados de espectros de fungos por espectroscopia no infravermelho

Foram avaliados os espectros de todos os fungos identificados por biologia molecular. Na FIGURA 30 é possível verificar que há diferenças no perfil de absorbância nos espectros dos isolados em todos os comprimentos de onda de importância biológica (QUADRO 2).

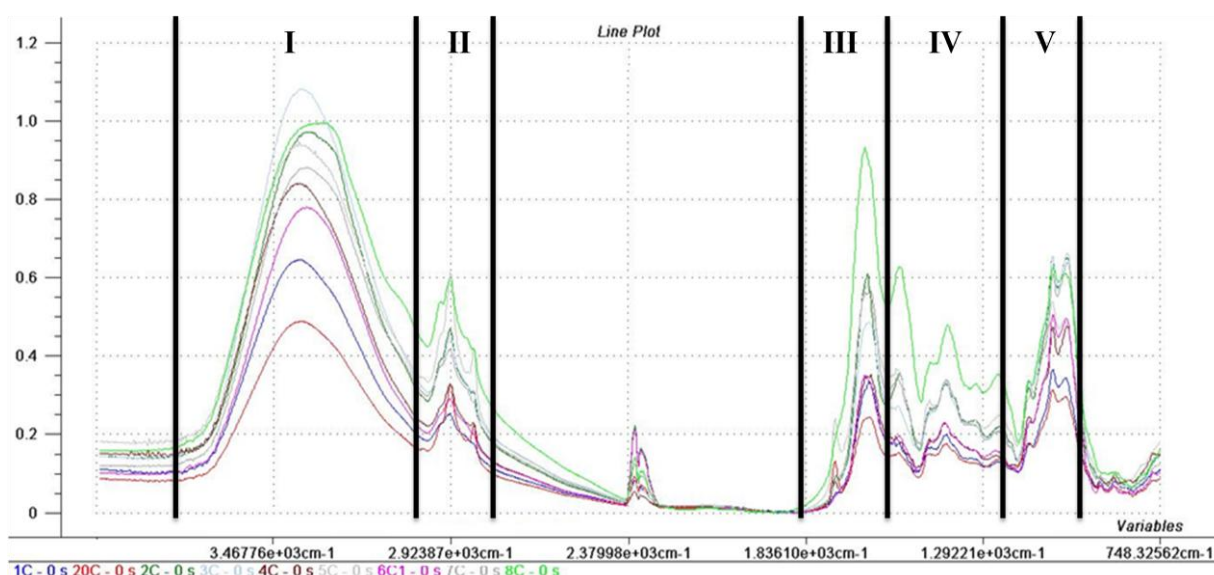


FIGURA 30 – ESPECTRO DE 9 ESPÉCIES DE FUNGOS ANALISADOS POR TRANSMITÂNCIA. REGIÕES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA: (I) PROTEÍNAS E LIPÍDEOS, (II) LIPÍDEOS, (III) PROTEÍNAS, (IV) PROTEÍNAS E LIPÍDEOS, (V) POLISSACARÍDEOS.

Legenda: *Lecythophora* sp. (azul escuro), *Aspergillus terreus* (vermelho), *Penicillium shearii* (verde escuro), *Westerdykella dispersa* (azul claro), *Bionectria ochroleuca* (marrom), *Hypoxyton fragiforme* (cinza claro), *Sporothrix inflata* (rosa), *Auxarthron chlamydosporum* (cinza escuro) e *Talaromyces stipitatus* (verde claro).

Fonte: O autor (2013)

O objetivo da análise foi fazer a comparação qualitativa entre os diferentes gêneros. Por isso, foi considerada apenas a perfil de altura entre os picos, e não a intensidade de cada banda separadamente.

Apesar das diferenças visíveis, não foi possível fazer a separação adequada dos fungos quanto ao gênero, mesmo após a utilização de vários pré-tratamentos (FIGURA 31). Isso se deve à falta de homogeneidade no número de amostras, uma vez que há muitos gêneros com apenas um isolado (grupos 1, 3, 4, 6, 7, 9 e 11), enquanto um grupo apresenta número amostral grande (grupo 2). Por se tratar da criação de um modelo matemático, não se deve levar em consideração a frequência com a qual os fungos foram isolados, mas manter uma constância no número de representantes de cada grupo (CÔCCO, 2008).

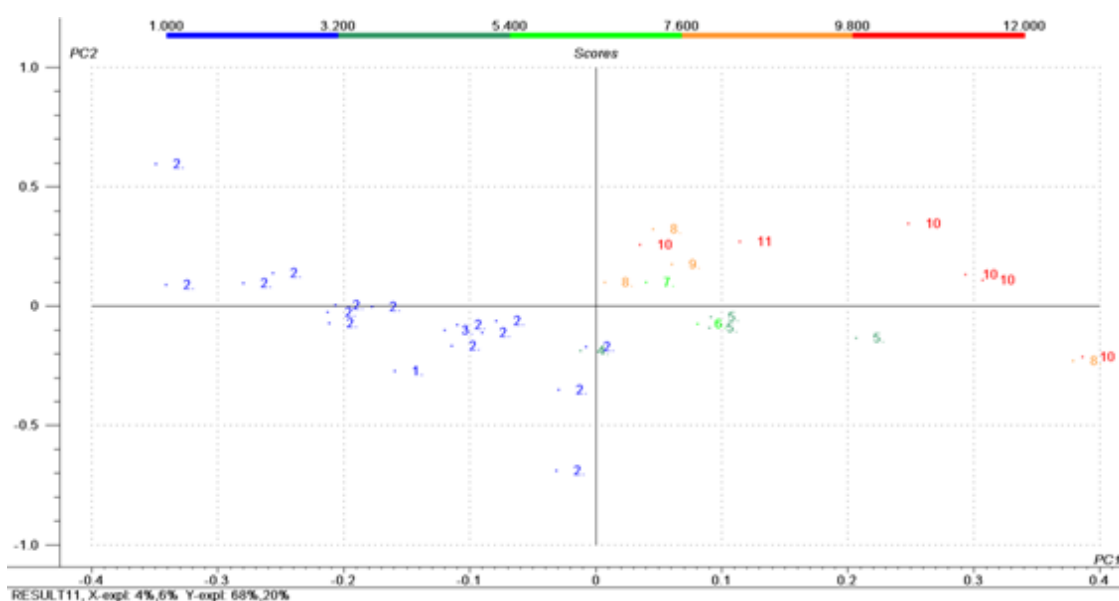


FIGURA 31 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS QUANTO AO GÊNERO POR TRANSMITÂNCIA

Legenda: *Lecythophora* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), *Westerdykella dispersa* (3), *Bionectria ochroleuca* (4), *Hypoxylon fragiforme* (5), *Sporothrix inflata* (6), *Auxarthron chlamydosporum* (7), *Talaromyces* sp. (8), *Microsphaeropsis arundinis* (9), *Aspergillus* sp. (10) e *Paecilomyces lilacinus* (11).

Fonte: O autor (2013)

Sendo assim, um novo modelo foi construído mantendo a uniformidade no número de amostras (FIGURA 32). Para tanto, alguns representantes do grupo 2 foram removidos, e foram feitas duplicatas dos gêneros com apenas um isolado. Isso é possível porque o objetivo da construção do modelo é a identificação entre os gêneros, independentemente se as amostras foram isoladas naturalmente ou replicadas em laboratório (TABELA 7).

TABELA 7 – LISTA, NÚMERO DE ISOLADOS FÚNGICOS E NÚMERO DE REPLICATAS UTILIZADOS NA CRIAÇÃO DO BANCO DE DADOS

Família	Gênero	Número de isolados	Replicatas
Sporormiaceae	<i>Westerdykella</i>	1	2
Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	3	1
Ophiostomataceae	<i>Sporothrix</i>	1	1
Bionectriaceae	<i>Bionectria</i>	1	2
Onygenaceae	<i>Auxarthron</i>	1	1
Xylariaceae	<i>Hypoxylon</i>	2	1
Trichocomaceae	<i>Talaromyces</i>	2	1
Coniochaetaceae	<i>Lecythophora</i>	1	2
Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	2	1
Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i>	1	1

Fonte: O autor (2013)

Após o pré-tratamento linha de base, foi realizada a regressão PLS1, com validação cruzada e 3 componentes principais.

Um modelo de regressão ideal deve apresentar valores de coeficientes de determinação de calibração e validação interna próximos a 1, ou 100%. Para o modelo obtido, tais valores foram, respectivamente, 94% e 92%, sendo possível fazer a separação dos gêneros, conforme assinalado na FIGURA 32. Para confirmação da eficiência do modelo, foi feita a validação externa, utilizando tanto amostras pertencentes ao modelo quanto isolados novos (TABELA 8).

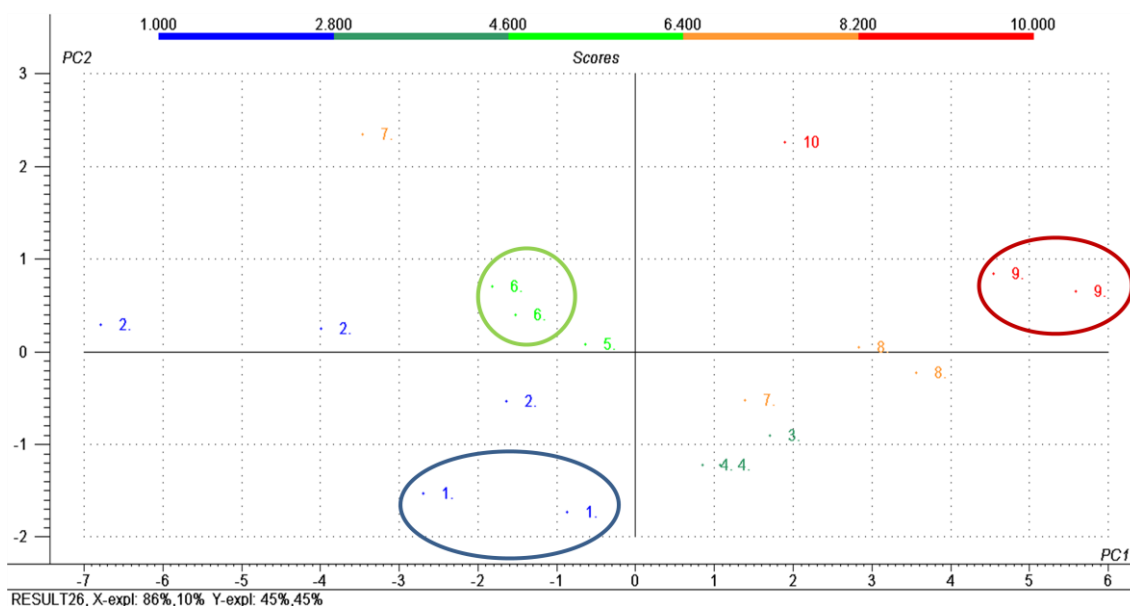


FIGURA 32 – SCORES REFERENTES À REGRESSÃO PLS1, INDICANDO A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS QUANTO AO GÊNERO POR TRANSMITÂNCIA

Legenda: *Westerdykella dispersa* (1), *Penicillium* sp. (2), *Sporothrix inflata* (3), *Bionectria ochroleuca* (4), *Auxarthron chlamydosporum* (5), *Hypoxylon fragiforme* (6), *Talaromyces* sp. (7), *Lecythophora* sp. (8), *Aspergillus* sp. (9) e *Paecilomyces lilacinus* (10).

Fonte: O autor (2013)

TABELA 8 – PREDIÇÃO DAS AMOSTRAS DE FUNGOS QUANTO AO GÊNERO POR TRANSMITÂNCIA

Amostra	Grupo real	Grupo predito
E1	2	2
E2	2	6
E3	10	10
E4	9	9
E5	6	5
E6	6	7
E7	4	4
E8	6	6
E9	7	7
E10	1	1
E11	7	7
E12	9	8

Fonte: O autor (2014)

Apesar de conseguir prever um grande número de isolados, o modelo falhou na identificação das amostras E2, E5, E6 e E12. Isso significa que o mesmo não é robusto para todos os gêneros, devido ao número baixo de representantes em cada grupo. Para melhorá-lo, novas amostras de cada grupo, sejam isolados novos ou replicatas, devem ser feitas para abranger o espaço amostral necessário.

Diferente da técnica realizada com bactérias, os compostos internos presentes nos fungos também foram analisados, como polissacarídeos de reserva, ácidos nucleicos e lipídeos (NAUMANN, 2000). A grande variedade de macromoléculas presente no micélio permite uma separação mais específica, levando também em consideração a produção de metabólitos (LECELLIER *et al.*, 2014a). Devido a isso, gêneros hierarquicamente pouco próximos ficaram agrupados, por exemplo, *Bionectria* e *Sporothrix*. Entretanto, ambos são parasitas causadores de doenças em animais.

Naumann (2009) conseguiu classificar 26 isolados de 24 espécies de Basidiomycota utilizando ATR. Entretanto, a análise de dados foi feita de maneira diferenciada, utilizando rede neural artificial ao invés da regressão PLS1.

A reflectância total atenuada também foi satisfatória para identificação de fitopatógenos dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Verticillium* em nível de espécie e em nível de linhagens (SALMAN *et al.*, 2012). Já Tralamazza *et al.* (2013) utilizaram a metodologia de reflectância difusa para diferenciar isolados de *Aspergillus*, incluindo espécies quimicamente muito semelhantes como *A. niger* e *A. carbonarius*.

Lecellier *et al.* (2014a) também puderam identificar fungos filamentosos quanto ao gênero e espécie com 98% de acerto. Contudo, a metodologia de preparo de amostra exige muitas etapas, além de se tratar de suspensões aquosas ao invés do pó micelial. Em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, foi possível desenvolver um banco de dados com 486 fungos filamentosos encontrados em alimentos. Os autores conseguiram transferir o banco para outros espectrofotômetros, e conseguiram fazer a identificação de 65% das amostras, enquanto que, utilizando o mesmo equipamento, a porcentagem de predição correta foi de 90%. Essas diferenças estão relacionadas às variações entre os equipamentos (LECELLIER *et al.*, 2014b).

A metodologia de transmitância utilizada nesse trabalho não é comumente utilizada para identificação de fungos. Além disso, o preparo de amostra realizado é simples, e não requer muitas etapas prévias, facilitando a utilização da espectroscopia no infravermelho na classificação de fungos filamentosos.

5.10 Avaliação da eficiência *in vitro* dos antimicrobianos MXD-100, hidróxido de sódio, Orobor, e extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*) no controle de micro-organismos isolados dos corpos de prova

Os antimicrobianos foram testados nas seguintes concentrações: Orobor 2,5 mL/L, 5,0 mL/L e 10 mL/L (LUCKMANN *et al.*, 2011); MXD-100 0,05 ppm (MAXCLEAN, 2007), 1 ppm e 3 ppm (MÄDER NETTO, 2011); NaOH pH 9, pH 12 e pH 14 (MÄDER NETTO, 2011); extrato metanólico de aroeira 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL (MOURA-COSTA *et al.*, 2012); e extrato aquoso de erva-mate 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL (TSAI *et al.*, 2010). A gentamicina foi utilizada como controle positivo para *Pseudomonas* e *Citrobacter*, enquanto a vancomicina é o controle para bactérias Gram-positivas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

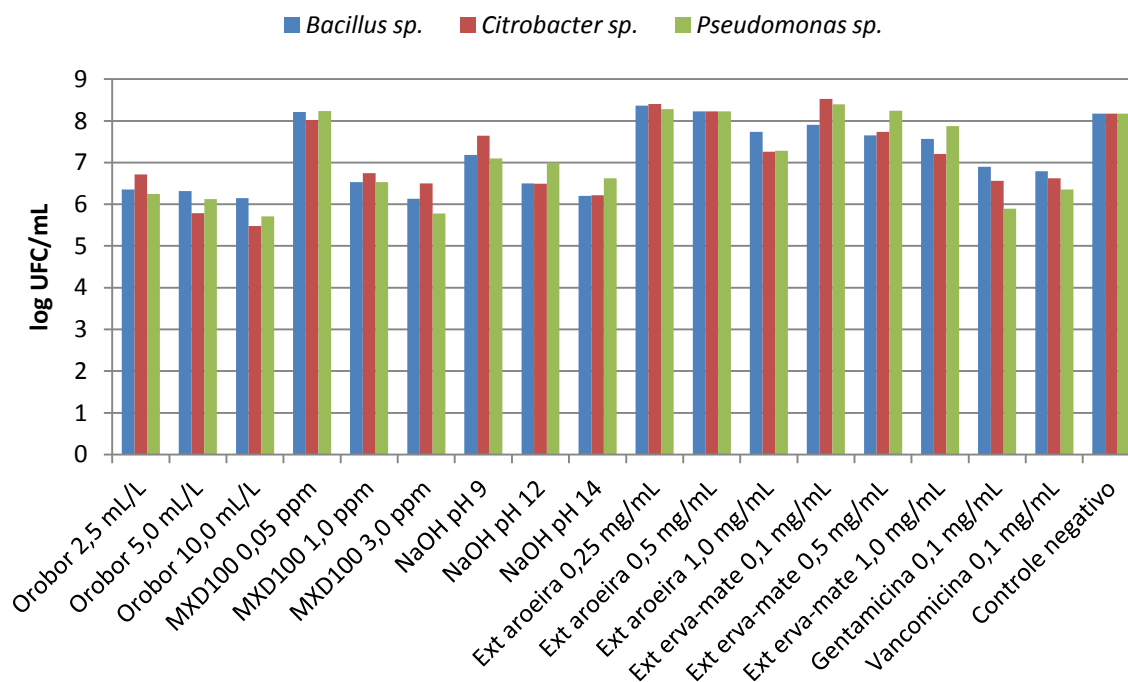


GRÁFICO 6 – EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS CONTRA AS BACTÉRIAS *Bacillus sp.*, *Citrobacter sp.* e *Pseudomonas sp.* ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ

Fonte: O autor (2014)

Analisando cada bactéria isoladamente (GRÁFICO 6), pode-se verificar que os antimicrobianos mais eficientes foram Orobor em todas as concentrações, MXD-100 1 e 3 ppm e NaOH pH 12 e 14, com valores comparáveis aos dos controles positivos. A queda no número de UFC/mL foi da ordem de duas unidades logarítmicas em relação ao controle negativo para estes biocidas.

Estes mesmos antimicrobianos foram os que apresentaram melhores resultados contra o pool contendo as bactérias do gênero *Bacillus*, *Citrobacter* e *Pseudomonas* (GRÁFICO 7). Os valores foram estatisticamente mais satisfatórios que os dos controles positivos, visto que os antibióticos são específicos para bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, enquanto os biocidas são eficientes contra todos os tipos bacterianos (APÊNDICE 3).

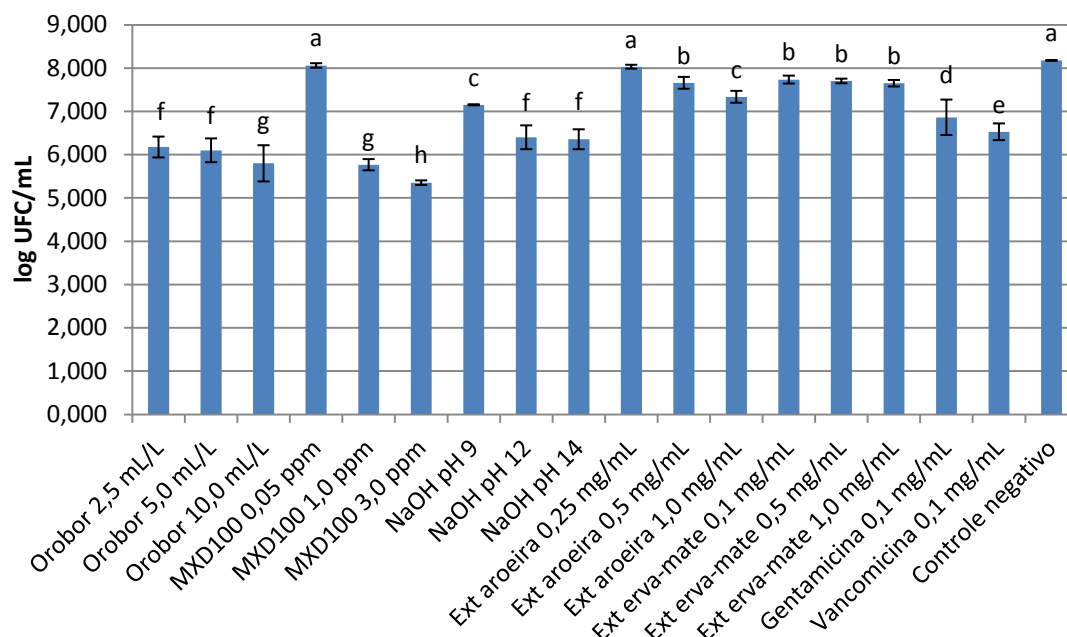


GRÁFICO 7 – EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS CONTRA POOL DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ

Nota: Análise estatística pelo teste de Scott-Knott (com probabilidade ao nível de 5%). Amostras com letras iguais apresentam igualdade estatística.

Fonte: O autor (2014)

O extrato de aroeira diminuiu a concentração das bactérias no pool de 10^8 UFC/mL para 10^7 UFC/mL nas concentrações mais altas, 0,5 e 1,0 mg/mL. Apesar de serem valores significantes, essa variação foi pequena em relação aos demais antimicrobianos. Segundo Moura-Costa *et al.* (2012), a concentração inibitória mínima do extrato bruto contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* foi de 1,0 mg/mL, conforme verificado no presente trabalho. Já Gehrke *et al.* (2013) conseguiram inibição na concentração de 0,25 mg/mL, e letalidade em 0,5 mg/mL, utilizando o extrato de outra espécie de aroeira (*Schinus lentiscifolius*). O uso de óleos essenciais extraídos a partir da aroeira obteve resultados de inibição semelhantes, entre 0,5 e 1,0 mg/mL (MARTINS *et al.*, 2014).

O extrato de erva-mate inibiu o crescimento das bactérias testadas separadamente em aproximadamente 0,5 unidade logarítmica nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL. Já no teste com o pool, a eficiência foi a mesma em todas as concentrações testadas. Oh *et al.* (2013) testaram a eficiência do chá de erva-mate contra *Staphylococcus* e *Listeria*, mostrando valores de concentração inibitória mínima de 5 mg/mL. Outros trabalhos

apresentaram concentração mínima de 1 mg/ml para inibir o crescimento de *Propionibacterium acnes* (TSAI *et al.*, 2010); para diferentes linhagens de *Escherichia coli* obteve-se valores acima de 0,2 mg/mL, enquanto para *Staphylococcus aureus* apenas 25 µg/mL se mostrou eficiente (BURRIS *et al.*, 2011).

No teste de microdiluição para fungos, foi utilizado como controle positivo a nistatina, antifúngico normalmente associado em infecções causadas por *Candida*, mas que também atua contra fungos filamentosos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Ao testar os antimicrobianos contra o fungo *Penicillium citrinum*, os melhores resultados foram MXD-100 a 1 e 3 ppm e NaOH pH 14, comparáveis a nistatina (APÊNDICE 4). Entretanto, Orobor 10 mL/L, NaOH pH 12 e o extrato de erva-mate também apresentaram resultados estatisticamente favoráveis (GRÁFICO 8).

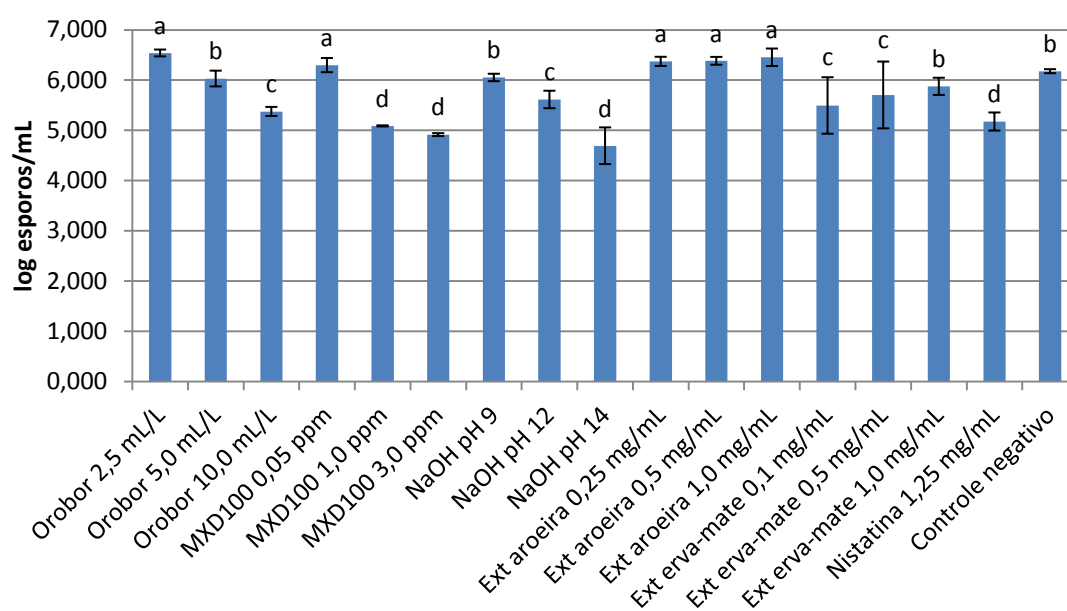


GRÁFICO 8 – EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS CONTRA O FUNGO *Penicillium citrinum*, ISOLADO A PARTIR DE CORPOS DE PROVA METÁLICOS EXPOSTOS EM ESTAÇÕES DE CORROSÃO NA USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ

Nota: Análise estatística pelo teste de Scott-Knott (com probabilidade ao nível de 5%). Amostras com letras iguais apresentam igualdade estatística.

Fonte: O autor (2014)

O extrato de aroeira favoreceu o crescimento fúngico em relação ao controle negativo, porém tais dados não corroboram com os encontrados na literatura. Moura-Costa *et al.* (2012) conseguiram uma concentração inibitória mínima de 0,5 µg/mL contra *Candida albicans* e 4 µg/mL contra *C. parapsilosis*.

Em outro trabalho, valores de 0,25 mg/mL foi obtido para *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans* (GEHRKE *et al.*, 2013). Martins *et al.* (2014) testou o extrato de *Schinus molle* contra os fungos filamentosos *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Fusarium*. Para *Rhizopus*, a concentração inibitória mínima foi de 0,5 mg/mL; para *Aspergillus niger* foi 1 mg/mL e para *Fusarium* foi superior a 1 mg/mL.

A concentração de 0,1 mg/mL de extrato de erva-mate foi suficiente para diminuir a concentração de esporos. Entretanto, o extrato mostrou-se eficiente no controle do fungo *Malassezia furfur* apenas na concentração de 1000 mg/mL (FILIP; DAVICINO; ANESINI, 2010). Salienta-se que os valores de concentração inibitória mínima foram citados para apresentar a eficiência dos extratos como antimicrobianos, e não podem ser comparados com o do presente trabalho. Não foi encontrada na literatura a influência dos mesmos quando testados contra um pool de micro-organismos.

Os antimicrobianos mais adequados para o controle dos micro-organismos isolados a partir dos corpos de prova da Usina de Tucuruí são Orobor 5 mL/L, Orobor 10 mL/L, MXD-100 1 ppm, MXD-100 3 ppm, NaOH pH 12 e NaOH pH 14.

É conhecido o efeito do óleo essencial da laranja no controle de bactérias e fungos, e sua capacidade citotóxica está relacionada à atividade antioxidante inerente aos componentes voláteis dos óleos (BAKKALI *et al.*, 2008). Os óleos essenciais podem inclusive prevenir a formação de biofilmes de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2014).

O hidróxido de sódio nos pH 12 e 14, apesar de eficiente, não é o ideal para utilização in situ devido a alterações na água causadas pela alcalinidade. O uso do NaOH pH 9 é o ideal para implantação na Usina (MÄDER NETTO, 2011), quando tomados os devidos cuidados para instalação. Este trabalho mostrou que tal faixa de pH conseguiu controlar o crescimento microbiano, mesmo não apresentando os melhores resultados.

Confirmou-se que o MXD-100, já utilizado na Usina Hidrelétrica de Tucuruí, é eficiente no controle de fungos e bactérias. A concentração mínima indicada pelo fabricante, 0,05 ppm, não conseguiu inibir o crescimento

microbiano, mas a concentração de 1 ppm foi suficiente para reduzir a quantidade de bactérias e esporos fúngicos.

O conhecimento sobre a microbiota pertencente ao biofilme presentes na Usina Hidrelétrica de Tucuruí possibilitou estabelecer o melhor biocida a ser utilizado para o controle eficiente da formação de filmes microbianos.

6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho foi possível isolar bactérias e fungos conhecidos como potenciais causadores de biocorrosão. O número de micro-organismos isolados não difere estatisticamente em relação ao material do corpo de prova, mas a contagem foi menor no período em que a vazão do rio diminuiu.

Foram isoladas 358 bactérias, sendo 52% Gram positivas, com predomínio do gênero *Bacillus*. Dentre as bactérias Gram negativas, pode-se citar *Citrobacter* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Acinetobacter* sp;

As bactérias oxidantes do ferro estavam presentes em 42% das amostras, enquanto bactérias redutoras de sulfato apareceram em 62,5% dos corpos de prova, segundo abordagem molecular.

Foram isolados 94 fungos, predominantemente do gênero *Penicillium*. Outros gêneros encontrados foram *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*. É a primeira vez que as espécies *Hypoxylon fragiforme*, *Auxarthron chlamydosporum*, *Talaromyces stipitatus* e *Talaromyces amestolkiae* são encontradas em ambientes aquáticos.

Quanto a espectroscopia no infravermelho, novas análises deverão ser realizadas com as bactérias para melhor padronização da técnica. Já para os fungos, a espectroscopia se mostrou eficaz para classificação de fungos em nível de gênero. A formação do banco de dados de espectros fúngicos apresentou calibração de 94% para separação de amostras.

Os antimicrobianos MXD-100 1 ppm e 3 ppm, Orobor 10 mL/L e NaOH pH 14 foram os mais eficientes no controle de bactérias e fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M. Fourier transform infrared spectroscopy to assist in taxonomy and identification of foodborne microorganisms. In: **Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology**. Edição: ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M. Berlin: Springer, 2012.

ANA. **Agência Nacional de Águas**. 2012. Disponível em www.hidroweb.ana.gov.br (acesso em junho de 2012).

ANEEL. **Agência Nacional de Energia Elétrica**. 2014. Disponível em www.aneel.gov.br (acesso em janeiro de 2014).

ANGELINI, P.; RUBINI, A.; GIGANTE, D.; REALE, L.; PAGIOTTI, R.; VENANZONI, R. The endophytic fungal communities associated with the leaves and roots of the common reed (*Phragmites australis*) in Lake Trasimeno (Perugia, Italy) in declining and healthy stands. **Fungal Ecology**, v.5, p.683-693, 2012.

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012.

APHA; AWWA; WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20^aed. Edição: CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. Washington: American Public Health Association, 1999.

BADALI, H.; CARVALHO, V.O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; KWIATKOWSKI, I.B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE HOOG, G.S. *Gladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of *Chaetothyriales* revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v.47, p.55-66, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BALL, D.W. **The Basics of Spectroscopy**. Washington: Spie Press, 2001.

BARTH, A.; HARRIS, P. Infrared Spectroscopy - Past and Present. **Biological Infrared Spectroscopy - Advances in Biomedical Spectroscopy**, v.2, p.1-52, 2009.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 3.ed. New York: MacMillan, 1972.

BEECH, I.B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – Current understanding and state-of-the-art methods of study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.53, p.177-183, 2004.

BEECH, I.B.; SUNNER, J.A. Biocorrosion in drinking water distribution systems. In: **Interface Science in Drinking Water Treatment**. Edição: NEWCOMBE, G.; DIXON, D. London: Elsevier Academic Press, 2006.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier Transform-Infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.305-319, 2007.

BLYSKAL, B. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.63, p.631–653, 2009.

BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. **The Staden Package Manual**. Cambridge: Medical Research Council, 2002.

BOULÉTREAU, S.; CHARCOSSET, J.Y.; GAMBY, J.; LYAUTEY, E.; MASTRORILLO, S.; AZÉMAR, F.; MOULIN, F.; TRIBOLLET, B.; GARABETIAN, F. Rotating disk electrodes to assess river biofilm thickness and elasticity. **Water Research**, v.45, p.1347-1357, 2011.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 136, p.378-384, 2011.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSENET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v.27, n.9, p.1017-1032, 2011.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMAN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12ª edição. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.

BRYANT, T.N. Computerizes identification of bacteria. In: **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Edição: SCHAECHTER, M. e LEDERBERG, J. London: Elsevier Academic Press, 2004.

BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974.

BURRIS, K.P.; DAVIDSON, P.M.; STEWART JR, C.N.; HARTE, F.M. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.456-462, 2011.

CAMO ASA. **Unscrambler Users Guide – ProGramme Package for Multivariate Calibration**. Norway: Trondheim, 1997.

CHAPELA, I.H.; PETRINI, O.; BIELSER, G. The physiology of ascospore eclosion in *Hypoxylon fragiforme*: Mechanisms in the early recognition and establishment of an endophytic symbiosis. **Mycological Research**, v.97, n.2, p.157-162, 1993.

CHEN, Y.; PRIOR, B.A.; SHI, G.; WANG, Z. A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. **The Journal of Microbiology**, v.49, n.4, p.675-679, 2011.

CHIOTTA, M.L. SUSCA, A.; STEA, G.; MULÈ, G.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A.; CHULZE, S.N. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.171-176, 2011.

CINDRA FONSECA, M.; BASTOS, I.N.; BAGGIO-SAITOVITCH, E.; SÁNCHEZ, D.R. Characterization of oxides of stainless steel UNS S30400 formed in offshore environment. **Corrosion Science**, v.55, p.34-39, 2012.

CLUM, F.M. A new genus in the Aspergillaceae. **Mycologia**, v.47, n.6, p.899-901, 1955.

CÔCCO, L.C. **Previsão de propriedades físico-químicas e composição química da gasolina a partir de espectros no infravermelho**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Departamento de Física, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COETSER, S.E.; CLOETE, T.E. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. **Critical Reviews in Microbiology**, v.31, p.213-232, 2005.

CRISTIANI, P.; PERBONI, G. Antifouling strategies and corrosion control in cooling circuits. **Bioelectrochemistry**, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.01.002>

DALY, K.; SHARP, R.J.; MCCARTHY, A.J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulphate-reducing bacteria. **Microbiology**, v.146, p.1693-1705, 2000.

DE HOOG, G.S. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella*. **Studies in Micology**, v.7, p.34, 1974.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**. Washington: ASM Press, 2001.

DE LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.137-147, 2006.

ELVERS, K.T.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms and Biofouling. In: **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Edição: SCHAECHTER, M. e LEDERBERG, J. London: Elsevier Academic Press, 2004.

FILIP, R.; DAVICINO, R.; ANESINI, C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. **Phytotherapy Research**, v.24, n.5, p.715-719, 2010.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, v.8, p.623-633, 2010.

FHWA. Federal Highway Administration. In: **Corrosion Costs and Preventive Strategies in the United States** (FHWA-RD-01-156). Washington: 2002.

GEHRKE, I.T.S.; NETO, A.T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C.P.; CRUZ, I.B.M.; SILVA, U.F.; ILHA, V.; DALCOL, I.I.; MOREL, A.F. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, p.486-491, 2013.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p.503-512, 2002.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1323-1330, 1995.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAZ, R.G.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot. **Persoonia**, v.26, p.47-56, 2011.

GOMES, F.S.; PROCOPIO, T.F.; LIMA T.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Isolation and Antimicrobial Activity of Lectin from *Schinus terebinthifolius* Leaves. **Journal of Biotechnology**, v.150, p.453, 2010.

GOOGLE EARTH. 2014. Disponível em maps.google.com.br (acesso em janeiro de 2014).

GRIFFITHS, P.R.; DE HASETH, J.A. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. 2ª edição. New Jersey: John Wiley and Sons Inc, 2007.

HALL, M. KEELING, J.; BRUMBLE, L. *Microsphaeropsis arundinis*: Case report of cutaneous infection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.60, n.3, p.AB115, 2009.

JAIN, A.; GUPTA, Y.; AGRAWAL, R.; KHARE, P.; JAIN, S.K. Biofilms – A Microbial Life Perspective: A Critical Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.24, n.5, p.393-443, 2007.

JAN-ROBLERO, J.; ROMERO, J.M.; AMAYA, M.; LE BORGNE, S. Phylogenetic Characterization of a Corrosive Consortium Isolated from a Sour Gas Pipeline. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.862-867, 2004.

JEFFERSON, K.K. What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p.163-173, 2004.

JUZELIŪNAS, E.; RAMANAUKAS, R.; LUGAUSKAS, A.; LEINARTAS, K.; SAMULEVIČIENĖ, M.; SUDAVIČIUS, A.; JUŠKĖNAS, R. Microbially Induced Corrosion of Zinc and Aluminium – Two-year Subjection to Influence of *Aspergillus niger*. **Corrosion Science**, v.49, p.4098-4112, 2007.

KALIA, V.C. Quorum Sensing Inhibitors: An Overview. **Biotechnology Advances**, v.31, p.224-245, 2013.

KERN, M.E. BLEVINS, K.S. In: **Micologia Médica**, p256. São Paulo: Premier, 1999.

KICKX, J. **Flore Cryptogamique des Environs de Louvain, ou Description Des Plantes Cryptogames et Agames qui Croissent Dans le Brabant et Dans Une Partie de la Province d'Anvers**. Bruxelles: Vandooren, 1835.

KINSEY, G.; PATERSON, R.; KELLEY, J. Filamentous Fungi in Water Systems. In: **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Edição: MARA, D.; HORAN, N. London: Elsevier Academic Press, 2003.

KIRSCHNER, C.; MAQUELIN, K.; PINA, P.; NGO-THI, N.A.; CHOO-SMITH, L.P.; SOCKALINGUM, G.D.; SANDT, C.; AMI, D.; ORSINI, F.; DOGLIA, S.M. ALLOUCH, P.; MAINFAIT, M.; PUPPELS, G.J.; NAUMANN, D. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.5, p.1763-1770, 2001.

KJELDAHL, K.; BRO, R. Some Common Misunderstandings in Chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v.24, p.558-564, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C.; WOODS, G. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LACTEC. Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento. In.: **Estudos para controle da deposição de lama ferruginosa (“fouling”) nos sistemas de resfriamento das usinas de Nova Ponte e Emborcação da Companhia Energética de Minas Gerais - CEMIG**. Relatório final. Curitiba: 2004.

LECELLIER, A.; MOUNIER, J.; GAYDOU, V.; CASTREC, L.; BARBIER, G.; ABLAIN, W.; MANFAIT, M.; TOUBAS, D.; SOCKALINGUM, G.D. Differentiation and Identification of Filamentous Fungi by High-Throughput FTIR Spectroscopic Analysis of Mycelia. **International Journal of Food Microbiology**, v.168-169, p.32-41, 2014a.

LECELLIER, A.; GAYDOU, V.; MOUNIER, J.; HERMET, A.; CASTREC, L.; BARBIER, G.; ABLAIN, W.; MANFAIT, M.; TOUBAS, D.; SOCKALINGUM, G.D. Implementation of an FTIR Spectral Library of 486 Filamentous Fungi Strains for Rapid Identification of Molds. **Food Microbiology**, 2014b.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.002>

LIN, W.; YU, Z.; CHEN, X.; LIU, R.; ZHANG, H. Molecular Characterization Of Natural Biofilms From Household Taps With Different Materials: PVC, Stainless Steel, And Cast Iron In Drinking Water Distribution System. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.18, p.8393-8401, 2013.

LUCKMANN, D.; GOUVEA, A.; SILVA, E.R.L.; GUGINSKI, C.; PEGORINI, C.S.; OLIVEIRA, T.M.; POTRICH, M. **Viabilidade de *Beauveria bassiana* Pulverizado com Produtos Alternativos**. In: Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2011.

MACIEL FILHO, C. L. **Estudos dos processos geoquímicos de obstrução defiltros de barragens**. Tese (Doutorado em Geociências) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

MÄDER NETTO, O.S. **Controle de incrustação de organismos invasores em materiais de sistemas de resfriamento de usinas hidrelétricas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Departamento de Física, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MAQUELIN, K.; KIRSCHNER, C.; CHOO-SMITH, L.P.; VAN DEN BRAAK, N.; ENDTZ, H.P.; NAUMANN, D.; PUPPELS, G.J. Identification Of Medically Relevant Microorganisms By Vibrational Spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v.51, p.255– 271, 2002.

MARANGONI, P.R.D. **Caracterização de biofilmes formados em superfícies metálicas e biocorrosão**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MARANGONI, P.R.D.; ROBL, D.; DALZOTO, P.R.; BERTON, M.A.C.; VICENTE, V.A.; PIMENTEL, I.C. Microbial Diversity of Biofilms on Metallic Surfaces in Natural Waters – Case Study in a Hydropower Plant on Amazon Forest. **Journal of Water Resource and Hydraulic Engineering**, v.2, n.4, p.140-148, 2013.

MARTINS, M.R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; TINOCO, M.T.; CRUZ-MORAIS, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, p.485-492, 2014.

MAXCLEAN. **Boletim Técnico MXD-100**. 2007. Disponível em www.maxcleanambiental.com.br (acesso em dezembro de 2011).

MOURA-COSTA, G.F.; NOCCHI, S.R.; CEOLE, L.F.; MELLO, C.P.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; TEMPONI, L.G.; NAKAMURA, T.U. Antimicrobial Activity of Plants Used as Medicinals on na Indigenous Reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, p.631–638, 2012.

MISTRY, B.D. **A Handbook of Spectroscopic Data**. Jaipur: Oxford Book Company, 2009.

NAUMANN, A. A Novel Procedure for Strain Classification of Fungal Mycelium by Cluster and Artificial Neural Network Analysis of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectra. **Analyst**, v.134, p.1215-1223, 2009.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Edição: MEYERS, R.A. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada**. Documento M38-A. Pennsylvania: NCCLS, 2002.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. Document M7-A6. 6^a Edição. Pennsylvania: NCCLS, 2003.

NEPPELENBROEK, K.H.; SEÓ, R.S.; URBAN, V.M.; SILVA, S.; DOVIGO, L.N.; JORGE, J.H.; CAMPANHA, N.H. Identification of *Candida* Species in the Clinical Laboratory: A Review of Conventional, Commercial, and Molecular Techniques. **Oral diseases**, 2013. DOI: 10.1111/odi.12123

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4^a edição. São Paulo: Sarvier, 2006.

NGO-THI, N.A.; KIRSCHNER, C.; NAUMANN, D. Characterization And Identification Of Microorganisms By FT-IR Microspectrometry. **Journal of Molecular Structure**, v.661-662, p.371-380, 2003.

NGUYEN, H.D.N.; YANG, Y.S.; YUK, H.G. Biofilm Formation of *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Acrylic Surfaces as Affected by Temperature and pH Level. **LWT – Food Science and Technology**, v.55, p.383-388, 2014.

OH, J.; JO, H.; CHO, A.R.; KIM, S.J.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activity of various leafy herbal teas. **Food Control**, v.31, p.403-409, 2013.

OLIVEIRA, B.R.; CRESPO, M.T.B.; SAN ROMÃO, M.V.; BENOLIEL, M.J.; SAMSON, R.A.; PEREIRA, V.J. New Insights Concerning the Occurrence of Fungi in Water Sources and Their Potential Pathogenicity. **Water Research**, v.47, p.6338-6347, 2013.

OLIVEIRA, M.M.E.; VERÍSSIMO, C.; SABINO, R.; ARANHA, J.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. First Autochthonic Case of Sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2014.

OSORIO, V.; PROIA, L.; RICART, M.; PÉREZ, S.; GINEBRED, A.; CORTINA, J.L.; SABATER, S.; BARCELÓ, D. Hydrological Variation Modulates Pharmaceutical Levels and Biofilm Responses in a Mediterranean River. **Science of the Total Environment**, v.472, p.1052–1061, 2014.

PAGE, R.D.M. Visualizing Phylogenetic Trees Using TreeView. **Current Protocols in Bioinformatics**, unit 6.2, 2002.

PALMER, C.J.; PASZKO-KOLVA, C. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Edição: SCHAECHTER, M. e LEDERBERG, J. London: Elsevier Academic Press, 2004.

PANNO, L.; BRUNO, M.; VOYRON, S.; ANASTASI, A.; GNAVI, G.; MISERERE, L.; VARESE, G.C. Diversity, Ecological Role and Potential Biotechnological Applications of Marine Fungi Associated to the Seagrass *Posidonia oceanica*. **New Biotechnology**, v.30, n.6, p.685-694, 2013.

PETTI, C.A. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. **Medical Microbiology**, v.44, p.1108-1114, 2007.

PILLAY, C.; LIN, J. Metal corrosion by aerobic bacteria isolated from stimulated corrosion systems: Effects of additional nitrate sources. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.83, p.158-165, 2013.

PIMENTEL, I.C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R.M.; AZEVEDO, J.L. Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under Different Environmental Conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.5, p.705-711, 2006.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* Antibacterial Activity of Some Plant Essential Oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.6, p.39, 2006.

PREISNER, O.; LOPES, J.A.; MENEZES, J.C. Uncertainty Assessment In FT-IR Spectroscopy Based Bacteria Classification Models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.94, p.33-42, 2008.

RAJASEKAR, A.; ANANDKUMAR, B.; MARUTHAMUTHUM, S.; TING, Y.P.; RAHMAN, P.K.S.M. Characterization of Corrosive Bacterial Consortia Isolated from Petroleum-Product-Transporting Pipelines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1175-1188, 2010.

RODRIGUEZ-CAVALLINI, E.; CRUZ, E. Un Método Sencillo para Generar Anaerobiosis en Tubos de Cultivo. **Revista Biomédica**, v.10, p.103-106, 1999.

RUBIO, C.; OTT, C.; AMIEL, C.; DUPONT-MORAL, I.; TRAVERT, J.; MARIEY, L. Sulfato/Thiosulfato Reducing Bacteria Characterization By FT-IR

Spectroscopy: A New Approach To Biocorrosion Control. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.287-296, 2006.

SALMAN, A.; LAPIDOT, I.; POMERANTZ, A.; TSROR, L.; SHUFAN, E.; MOREH, R.; MORDECHAI, S.; HULEIHEL, M. Identification of Fungal Phytopathogens Using Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopy And Advanced Statistical Methods. **Journal of Biomedical Optics**, v.17, n.1, 2012.

SANTOS, C.; FRAGA, M.E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier Transform Infrared As A Powerful Technique For The Identification And Characterization Of Filamentous Fungi And Yeasts. **Research in Microbiology**, v.161, p.168-175, 2010.

SCHMITT, J.; FLEMMING, H.C. FTIR-Spectroscopy in Microbial and Material Analysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p.1-11, 1998.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODE CONSORTIUM. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region As A Universal DNA Barcode Marker For Fungi. **PNAS**, v.109, n.16, p. 6241-6246, 2012.

SCHROERS, H.J.; SAMUELS, G.J. *Bionectria*: A Genus For Species Of The *Nectria ochroleuca* Group. **Zeitschrift für Mykologie**, v.63, n.2, p.149-154, 1997.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Clinical Infectious Disease**, v.49, n.4, p.543-551, 2009.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture 7**. Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. VIEIRA, M.J. A Review Of Current And Emergent Biofilm Control Strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v.43, p.573-583, 2010.

SIQUEIRA, V.M.; OLIVEIRA, H.M.B.; SANTOS, C.; PATERSON, R.M.; GUSMÃO, N.B.; LIMA, N. Filamentous Fungi in Drinking Water, Particularly in Relation to Biofilm Formation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, n.2, p.456-469, 2011.

SOLÉ, M.; CANO, J.; STCHIGEL, A.M.; GUARRO, J. Two New Species Of *Auxarthron* Morphologically And Genetically Close to *A. kuehnii*. **Studies in Micology**, v.47, p.103-111, 2002.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 8ª edição. Vol. 1. LTC, 2005.

SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TADPETCH, K.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; SAKAYAROJ, J. Modiolin and Phthalide Derivatives from the Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18. **Tetrahedron**, v.68, p.10005-10010, 2012.

SONDOSSI, M. Biocides (Nonpublic health, Nonagricultural antimicrobials). In: **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Edição: SCHAECHTER, M. e LEDERBERG, J., 147-160. London, UK: Elsevier Academic Press, 2004.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm Formation In Food Industries: A Food Safety Concern. **Food Control**, v.31, p.572-585, 2013.

STADLER, M.; QUANG, D.N.; TOMITA, A.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Changes in Secondary Metabolism During Stromatal Ontogeny of *Hypoxylon fragiforme*. **Mycological Research**, v.110, p.811-820, 2006.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: CMI, 1980.

SWOFFORD, D.L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (and Other Methods), Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v.36, n.1, p.224-229, 2014.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TISCHLER, J.S.; JWAI, R.J.; GELHAAR, N.; DRESCHSEL, A.; SKIRL, A.M.; WIACEK, C.; JANNECK, E.; SCHLÖMANN, M. New Cultivation Medium For “*Ferrofum*” And *Gallionella*-Related Strains. **Journal of Microbiological Methods**, v.95, n.2, p.138-144, 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRALAMAZZA, S.M.; BOZZA, A.; DESTRO, J.G.R.; RODRÍGUEZ, J.I.; DALZOTO, P.R.; PIMENTEL, I.C. Potential of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) to Differentiate Environmental *Aspergillus* Fungi Species *A. niger*, *A. ochraceus*, and *A. westerdijkiae* Using Two Different Methodologies. **Applied Spectroscopy**, v.67, n.3, p.274-278, 2013.

TRÜPER, H.G.; SCHLEIFER, K. Prokaryote Characterization and Identification. In: **The Prokaryotes**. Edição: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. Berlin: Springer, 2006.

TSAI, T.H.; TSAI, T.S.; WU, W.H.; TSENG, J.T.P.; TSAI, P.J. *In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. **Food Chemistry**, v.119, p.964-968, 2010.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, A Consensus Approach To Bacterial Systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.60, n.2, p.407-438, 1996.

VIDELA, H.A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.49, p.259-270, 2002.

VIDELA, H.A.; HERRERA, L.K. Biocorrosion. In: **Studies in Surface Science and Catalysis**. Edição: VASQUEZ-DUHALT, R.; QUINTERO-RAMIREZ, R. London: Elsevier Academic Press, 2004.

WESLEY, S.B.; MAURYA, D.P.; GOYAL, H.S.; NEGI, S. Experimental Investigation of Microbiologically Influenced Corrosion of Selected Steels in Sugarcane Juice Environment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** (2013): DOI 10.1007/s11274-013-1402-5.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: INNIS, M.A. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic Press, 1990.

WINTERMUTE, E.H.; SILVER, P.A. Emergent Cooperation in Microbial Metabolism. **Molecular Systems Biology**, v.6, p.407, 2010.

ZARASVAND, K.A.; RAI, V.R. Microorganisms: Induction and Inhibition of Corrosion in Metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.87, p.66-74, 2014.

Apêndice 1 – Análise estatística da contagem bacteriana pelo Teste de Scott-Knott

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	23	262.66244	11.42011	6.0959 **
Resíduo	48	89.92428	1.87342	
Total	71	352.58672		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
23	48	2.2195	6.0959	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	6.77010 a
2	7.16060 a
3	8.12170 a
4	6.40670 a
5	7.43867 a
6	7.51843 a
7	7.30120 a
8	6.88040 a
9	7.67683 a
10	7.94090 a
11	7.42923 a
12	7.84480 a
13	8.11423 a
14	3.95503 b
15	4.43727 b
16	9.39803 a
17	0.30100 c
18	3.93480 b
19	7.18487 a
20	7.05140 a
21	7.85093 a
22	7.40013 a
23	8.32010 a
24	8.89400 a

MG = 6.88881

CV% = 19.87

Ponto médio = 4.88880

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

6.7953	6.5735	6.9415
7.3172	6.9318	7.2328
8.1258	8.2486	7.9907
6.1057	6.4067	6.7077
7.3751	7.5435	7.3974
7.4291	7.6778	7.4484
6.8745	6.9415	8.0876
6.9614	6.9614	6.7184
7.6140	7.7240	7.6925
7.7037	8.0928	8.0262
7.1565	8.0997	7.0315
7.8648	7.8909	7.7787
8.2812	8.0562	8.0053
7.6091	.3010	3.9550
8.5735	.3010	4.4373
9.3659	9.3516	9.4766
.3010	.3010	.3010
7.5686	.3010	3.9348
7.2059	7.1635	7.1852
7.2895	7.0359	6.8288
7.7883	7.8090	7.9555
7.4486	7.3588	7.3930
8.0732	8.4260	8.4611
8.5872	8.9817	9.1131

Apêndice 2 – Análise estatística da contagem fúngica pelo Teste de Scott-Knott

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	23	135.60597	5.89591	3.7975 **
Resíduo	48	74.52423	1.55259	
Total	71	210.13019		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
23	48	2.2195	3.7975	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	7.09047 a
2	7.30517 a
3	7.40440 a
4	7.19783 a
5	6.29707 a
6	6.28737 a
7	6.44587 a
8	6.26687 a
9	5.56860 a
10	5.56380 a
11	2.92770 b
12	3.51467 b
13	5.99813 a
14	6.31920 a
15	3.17580 b
16	6.94200 a
17	5.74910 a
18	3.08533 b
19	6.70390 a
20	7.41767 a
21	6.73960 a
22	6.93323 a
23	6.84927 a

24 6.55300 a

MG = 6.01400

CV% = 20.72

Ponto médio = 4.18240

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

7.7776 6.0964 7.3974
7.3172 7.3655 7.2328
7.3256 7.4832 7.4044
6.5828 7.0599 7.9508
6.0964 6.0964 6.6984
6.3877 6.0867 6.3877
6.4459 6.0964 6.7953
6.4174 6.1163 6.2669
5.5686 5.5686 5.5686
5.5638 5.5638 5.5638
2.9277 5.5544 .3010
3.5147 6.7283 .3010
5.9981 5.6091 6.3872
6.7852 6.0862 6.0862
6.0506 .3010 3.1758
7.2725 6.7496 6.8039
5.7491 5.5986 5.8996
3.0853 5.8697 .3010
5.5724 6.4755 8.0638
7.1533 7.4123 7.6874
6.7496 6.8957 6.5735
6.6527 6.8745 7.2725
6.6527 7.0206 6.8745
7.0649 6.4186 6.1755

Apêndice 3 – Análise estatística da eficiência dos biocidas contra o pool bacteriano pelo Teste de Scott-Knott

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	17	41.45925	2.43878	60.9037 **
Resíduo	36	1.44156	0.04004	
Total	53	42.90080		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
17	36	2.5095	60.9037	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	6.17807	f
2	6.06273	f
3	5.76637	g
4	8.05747	a
5	5.75353	g
6	5.34627	h
7	7.15083	c
8	6.40873	f
9	6.35237	f
10	8.02943	a
11	7.64367	b
12	7.32147	c
13	7.72747	b
14	7.70040	b
15	7.64513	b
16	6.86417	d
17	6.52820	e
18	8.17603	a

MG = 6.92846

CV% = 2.89

Ponto médio = 6.74250

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

```
-----  
5.9187 6.3958 6.2197  
6.3808 5.9037 5.9037  
5.6796 6.2207 5.3988  
8.0122 8.0460 8.1142  
5.6553 5.9008 5.7045  
5.4035 5.3365 5.2988  
7.1544 7.1605 7.1376  
6.7268 6.2497 6.2497  
6.2197 6.2197 6.6177  
8.0662 7.9791 8.0430  
7.7920 7.5231 7.6159  
7.4698 7.2009 7.2937  
7.8281 7.7048 7.6495  
7.6568 7.6849 7.7595  
7.6191 7.5863 7.7300  
6.6278 7.3369 6.6278  
6.7498 6.4013 6.4335  
8.1862 8.1687 8.1732  
-----
```

Apêndice 4 – Análise estatística da eficiência dos biocidas contra *Penicillium citrinum* pelo Teste de Scott-Knott

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	16	16.02853	1.00178	15.5777 **
Resíduo	34	2.18650	0.06431	
Total	50	18.21502		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
16	34	2.5781	15.5777	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	6.53567 a
2	6.01230 b
3	5.36837 c
4	6.29263 a
5	5.08663 d
6	4.91327 d
7	6.04690 b
8	5.61273 c
9	4.69927 d
10	6.37080 a
11	6.38257 a
12	6.45173 a
13	5.49517 c
14	5.70280 c
15	5.87113 b
16	5.17000 d
17	6.17483 b

MG = 5.77569

CV% = 4.39

Ponto médio = 5.45835

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

6.5399 6.6017 6.4654
6.0682 5.8347 6.1340
5.3611 5.2819 5.4621
6.3444 6.1334 6.4001
5.0802 5.0995 5.0802
4.9419 4.8840 4.9139
5.9631 6.0743 6.1033
5.7902 5.6059 5.4421
4.7409 5.0419 4.3150
6.3001 6.4730 6.3393
6.3661 6.4671 6.3145
6.2506 6.5481 6.5565
5.4641 6.0722 4.9492
5.7259 6.3556 5.0269
5.7355 6.0632 5.8147
5.3489 5.1728 4.9883
6.1643 6.2193 6.1409
